

Die Rolle des Prostaglandin-Signalweges im Rahmen der Nephrogenese bei der Maus

Vom Fachbereich Biologie der
Technische Universität Darmstadt



zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium

genehmigte
Dissertation von
Dipl. Biol. Stefanie Frölich
aus Frankfurt am Main

1. Referent: Prof. Dr. Rolf M. Nüsing
2. Referent: Prof. Dr. Ralf A. W. Galuske
3. Referent: Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 25.05.2012
Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2012

Darmstadt 2013
D17



**Die vorliegende Arbeit wurde am Uniklinikum Frankfurt
im Institut der Klinischen Pharmakologie
im Pharmazentrum Frankfurt
unter der Betreuung von
Herrn Prof. Dr. Dr. Rolf M. Nüsing angefertigt.**

Teile der Arbeit wurden eingereicht bzw. publiziert bei:

Olliges, A., **Wimmer, S.**, and R. M. Nüsing, 2011, Defects in mouse nephrogenesis induced by selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Br J Pharmacol. Jul;163(5):927-36

Frölich, S., A. Olliges, N. Kern, Y. Schreiber, S. Narumiya, and R. M. Nüsing, 2012, Temporal expression of the PGE2 synthetic system in kidney is associated with time frame of renal developmental vulnerability to cyclooxygenase-2 inhibition: Am J Physiol Renal Physiol. Jul 15;303(2):F209-19

Frölich S, Jensen B, Nüsing RM. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in COX dependent nephrogenesis; **in preparation**.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus den Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, Mai 2012

Vorname Nachname

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Niere	1
1.1.1	Das Nephron	1
1.2	Grundzüge der Nephrogenese	2
1.3	Cyclooxygenasen	6
1.4	Prostaglandine	8
1.4.1	Prostaglandine in der Niere	11
1.5	Cyclooxygenase-Knockout-Mäuse	13
1.6	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	15
1.6.1	Cyclooxygenasen und die Regulation von Renin	18
1.7	Fragestellungen	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Chemikalien	21
2.1.3	Verbrauchsstoffe	21
2.1.4	Puffer und Lösungen	22
2.1.5	Untersuchte Substanzen	24
2.1.6	Oligonukleotide	25
2.1.7	Versuchstiere	26
2.1.8	Software	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Tierversuche	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.3	Biochemische Methoden	35
2.2.4	COX-Aktivitäts Test	37
2.2.5	Messung der Plasma-Reninkonzentration	38
2.2.6	Statistik	38
3	Ergebnisse	39
3.1	COX-2 ^{-/-} -Mäuse	39
3.2	COX-Aktivität	41
3.3	PGE ₂ -Synthasen Expression	42
3.3.1	mPGES-1	42
3.3.1	mPGES-2	43
3.3.1	cPGES	43
3.4	Selektiver COX-2-Inhibitor SC-236	47
3.4.1	Bindegewebsfärbung mit Sirius Red	53
3.4.1	PGE ₂ Konzentration im Urin	56
3.4.2	Makrophagen	56
3.4.3	PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen)	57
3.5	COX-1-Knockout und SC-236 Behandlung	59
3.6	Selektiver COX-1-Inhibitor SC-560	62
3.7	Dexamethason	64
3.8	mPGES-1 Knockout-Mäuse	67
3.9	Prostanoidrezeptor Knockout-Mäuse	69
3.10	EP2-Rezeptor Blockade in EP4 ^{-/-} -Mäusen	72
3.11	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	75
3.11.1	Reninaktivität im Blutplasma	76

3.11.2	Telmisartan (AT ₁ -Rezeptor Antagonist)	77
3.11.3	PD123319 (AT ₂ -Rezeptor Antagonist)	84
3.11.4	Spironolacton (Aldosteron-Antagonist)	86
3.12	NaCl	89
3.12.1	PGE ₂ -Konzentration im Urin	93
3.13	Furosemid	95
3.13.1	PGE ₂ -Konzentration im Urin	98
3.14	Furosemid und SC-236	99
3.14.1	PGE ₂ -Konzentration im Urin	101
4	Diskussion	104
4.1	Mögliche Signaltransduktionsprozesse während der Nephrogenese	105
4.2	Cyclooxygenasen	106
4.3	PGE ₂ -Synthasen	110
4.4	Dexamethason	111
4.5	Prostanoidrezeptor Knockout-Mäuse	113
4.6	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	114
4.7	Salz und Furosemid	117
5	Zusammenfassung	119
6	Literaturverzeichnis	120
	Danksagung	128
	Curriculum Vitae	129

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
AMP	Adenosin-Monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AT II	Angiotensin II
AT ₁ bzw. AT ₂	Angiotensin II-Rezeptor, Subtyp 1 bzw. 2
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclic-AMP (cyclisches-AMP)
cDNA	copy-DNA
Cl ⁻	Chlorid
COX	Cyclooxygenase
C _t	Cycle threshold
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DP	Prostaglandin DP-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	epitheliale Na-channel
EP1-4	Prostaglandin E ₂ -Rezeptor, Subtyp 1-4
EtOH	Ethanol
FP	Prostaglandin F _{2α} -Rezeptor
g	Erdbeschleunigung, g = 9,81 m/ sec ²
HCl	Salzsäure
JG	juxtaglomerulär
KCl	Kaliumchlorid
i.p.	intra peritoneal
IP	Prostacyclin-Rezeptor
M	Molarität
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
H ₂ O	deionisiertes Wasser (Milli-Q mittels Reinstwasser)

Abkürzungsverzeichnis

Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NKCC2	Na-K-2Cl Cotransporter (Natrium-Kalium-2Chlorid Kotransporter)
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating cell Nuclear Antigen
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PGE ₂	Prostaglandin E2
PGH ₂	Prostaglandin H2
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonucleinsäure
RT	reverse Transkription
s.c.	sub cutan
SDS	sodiumdodecylsulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
SSW	Schwangerschaftswoche
TAE	Tris-Eisessig-EDTA
TAL	thick ascending loop of Henle (dicker aufsteigender Ast der Henle Schleife)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Die Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, welches zur Aufrechterhaltung der Homöostase wichtig ist (siehe Abb. 1). Sie gehört zu den am stärksten durchbluteten Organen des menschlichen Körpers. Zu ihren Aufgaben zählen die Regulation des Wasser- und Säure-Basen-Haushaltes und des Blutdrucks. Als Ausscheidungsorgan gibt die Niere harnpflichtige Stoffwechselprodukte ab wie Harnsäure, Harnstoff und Kreatinin, sowie körperfremde Stoffe wie z.B. Medikamente. Als endokrines Organ bildet die Niere die Hormone Renin zur kurzfristigen Blutdruckregulation, Erythropoetin zur Stimulation der Erythrozytenbildung, Calcitriol zur Bildung von Vitamin D und Prostaglandine. Des Weiteren ist die Niere neben der Leber maßgeblich an der Gluconeogenese beteiligt.

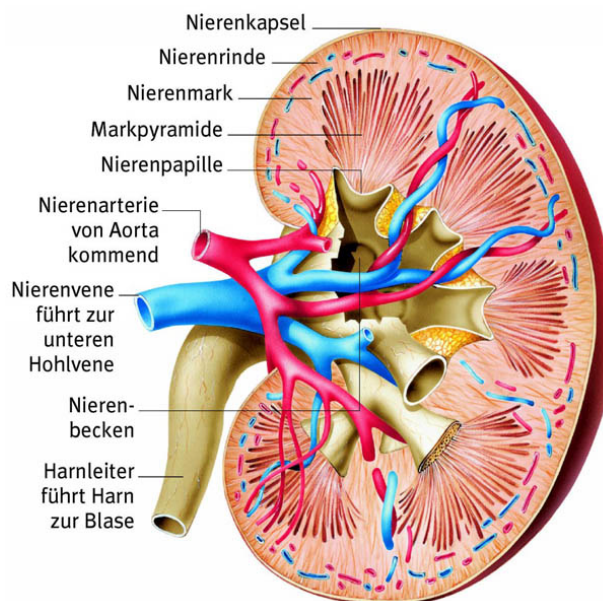


Abb. 1: Schematischer Längsschnitt durch die menschliche Niere
(Quelle: <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/niere/>)

1.1.1 Das Nephron

Die kleinste Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Eine gesunde menschliche Niere enthält etwa eine Million Nephrone. Das Nephron setzt sich zusammen aus der Bowman-Kapsel, die ein Glomerulus (Kapillarknäuel) umgibt, und den verschiedenen Tubuli. In den Glomeruli werden durch den Blutdruck Wasser, Harnstoff und Salze aus dem Blut in das Lumen der Bowman-Kapsel gepresst. Der so entstandene Primärharn gelangt zunächst in den proximalen Tubulus, dort werden Wasser und Salze resorbiert. Die Resorption von

Wasser setzt sich im absteigenden Ast der Henle-Schleife mit Hilfe des Gegenstromprinzips fort. Der aufsteigende Ast der Henle-Schleife dient nur der Resorption von Natriumchlorid, da er für Wasser undurchlässig ist. Im anschließenden distalen Tubulus wird der Primärharn durch selektiven Transport weiter aufkonzentriert. Die letzte Möglichkeit der Konzentrierung des Primärharns bilden die Sammelrohre, wo die Resorption weitgehend durch Hormone wie ADH oder Aldosteron beeinflusst wird. Damit wird eine maximale Konzentrierung zum Endharn erreicht. Der Endharn gelangt in das Nierenbecken und von dort über die Urethere in die Harnblase (siehe Abb. 2).

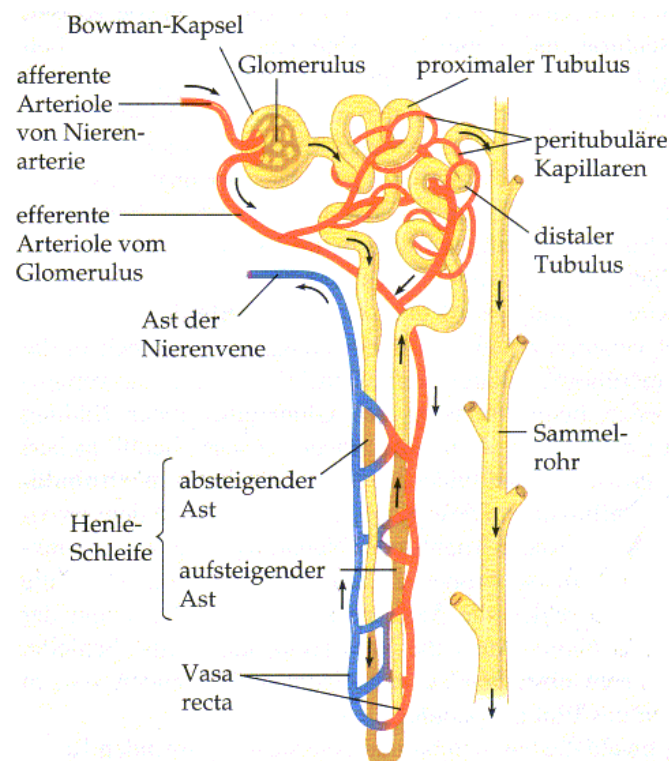


Abb. 2: Schematische Darstellung eines funktionalen Nephrons

Das Nephron ist die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Es besteht aus der Bowman-Kapsel, die den Glomerulus umgibt, dem proximalen und distalen Tubulus der Henle-Schleife und dem Sammelrohr, das von mehreren Nephronen geteilt wird. (Quelle: Campbell , 1997)

1.2 Grundzüge der Nephrogenese

Die starke Konservierung einzelner Gene zwischen den verschiedenen Spezies verdeutlicht die gemeinsame Herkunft der embryonalen Nieren aller Vertebraten. Die Entwicklung der Niere lässt sich an verschiedenen Modellorganismen (z.B. in *Xenopus*) gut beobachten und sogar *in vitro* nachahmen. Zu dem ermöglicht die Verwendung von Modellorganismen wie der Maus (*Mus musculus*) auch einen besseren Einblick in die Entwicklung der menschlichen Niere.

Die frühe Nierenentwicklung

Die frühe Embryonalentwicklung der Säugetiere verläuft nacheinander über drei verschiedene Nierenanlagen. Allerdings bleibt nur die zuletzt gebildete Anlage bestehen und übernimmt die Nierenfunktion. Der Bildungsort der Nierenentwicklung ist das intermediäre Mesoderm an der dorsalen Wand der embryonalen Leibeshöhle. Von kranial nach kaudal bilden sich dabei nacheinander folgende tubuläre Strukturen aus: der Pronephros (Vorniere), der Mesonephros (Urnier) und der bleibende Metanephros (Nachnier) (s. Abb. 3 E). Funktionelle Vornieren werden nur von niederen Vertebraten, wie *Xenopus* ausgebildet. Beim Menschen bildet sich am 22. Tag der Gestation am kranialen Teil der Pronephros aus. Er bleibt rudimentär und besteht aus wenigen Tubuli und Glomeruli, die sich aber bereits bis zum 25. Tag wieder zurückgebildet haben.

Durch weiter kaudalwärts gerichtete Aussprossung entwickelt sich der Wolffersche-Gang (Vornieren- bzw. Urnierengang). Dieser induziert beim Menschen ab dem 24. Tag die transiente Bildung des Mesonephros aus dem thorakalen Mesoderm. Der Mesonephros bildet pro Segment zwei bis drei birnenförmige Bläschen, die zu Tubuli auswachsen. Während das eine Ende der Tubuli in den Wolfferschen-Gang mündet, bildet das andere blinde Ende einen Trichter aus, die Bowman-Kapsel. Die Urnier enthält einige wenige funktionsfähige Nephrone, die bereits *in utero* Urin filtrieren können. Die Rückbildung des Mesonephros beginnt in der 8. Schwangerschaftswoche (SSW). Noch bevor der Mesonephros zurückgebildet ist, beginnt etwa am 32. Tag die Entwicklung des Metanephros. Der Metanephros entwickelt sich zeitlich und räumlich unabhängig von Pro- und Mesonephros durch Aussprossung der Ureterknospe aus dem Wolfferschen-Gang in das kaudal der Urnier gelegene metanephrogene Mesenchym.

Hierbei dient der durch das metanephrogene Blastem freigesetzte Botenstoff GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor), durch seine Bindung an den RET-Rezeptor im Wolfferschen-Gang als Induktionssignal zur Ausbildung der Ureterknospe (Hellmich et al., 1996). In der Folge bildet sich induziert vom metanephrogenem Blastem durch Wachstum und dichotome Verzweigungsmorphogenese (siehe Abb. 3 A und B) der Ureterknospe das Sammelrohrsystem der Niere. Parallel hierzu entwickeln sich aus dem metanephrogenen Mesenchym die Nephrone. Durch die Induktion der Ureterknospe unterzieht sich das metanephrogene Mesenchym hierbei einer Reihe von morphogenetischen Vorkommnissen, wodurch das locker angelegte Mesenchym in ein Epithel konvertiert wird (= mesenchymale – ephitheliale Transformation), das sich insbesondere durch die apiko-basolaterale Polarisierung auszeichnet. Dabei entwickeln sich, am Ende der 6. SSW aus dem kappenartig verdichteten metanephrogenen Blastem (Kappenmesenchym) durch Proliferation und Abschnürungen renale Vesikel im Nierencortex (s. Abb. 3 B). Der nicht kondensierte Anteil des Mesenchyms bildet das interstitielle Stroma. Durch longitudinales Wachstum der

Nierenbläschen und eine Serie von Einstülpungen und Ausdehnungen bilden sich aus diesen zunächst Komma-förmige Vesikel. Durch eine Spaltenbildung am proximalen und distalen Pol entwickelt es sich zu einem S-förmigen Vesikel, aus denen dann die gewundenen Nierentubuli hervorgehen (s. Abb. 3 C). Der genaue Prozess der Modellierung von Komma- und S-förmigen Vesikeln ist bislang noch unverstanden. Aus dem oberen Abschnitt der Tubuli entwickeln sich später der distale Tubulus und der aufsteigende Ast der Henle-Schleife. Aus dem mittleren Abschnitt gehen der proximale Tubulus und der absteigende Ast der Henle-Schleife hervor. Der untere Abschnitt bildet an seinem Ende eine Art Trichter, die Bowman-Kapsel, aus. In dessen löffelartiger Vertiefung bildet sich ein Gefäßknäuel aus, der Glomerulus (s. Abb. 3 D). Sie fusionieren distal mit dem Sammelrohrsystem.

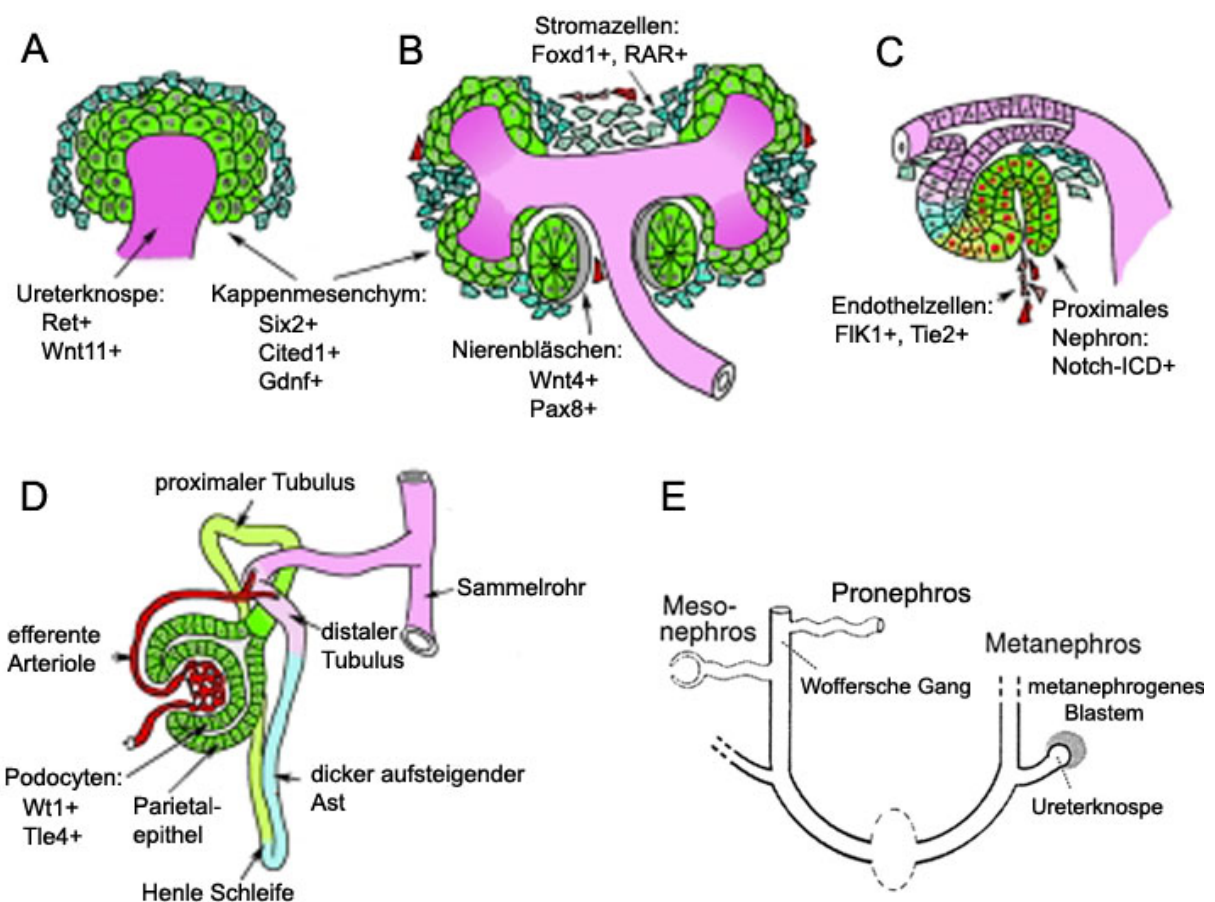


Abb. 3: Nephron Entwicklung und Zellabstammung Das Einwandern der Ureterknospe (lila) in das metanephrogene Mesenchym (grün, MM) liefert das induzierende Signal zur Nephrogenese.

(A) Einwanderung der Ureterknospe induziert die MM-Zellen zur Kondensierung um die Spitzen der Ureterknospe (B) Das Kappenmesenchym polarisiert zu einem epithelialen Kreis, das Nierenbläschen. (C) Das Nierenkörperchen fusioniert zum renalen Stiel, aus welchem sich die Sammelrohre bilden und formen einen S-förmigen Vesikel mit einer distalen und proximalen Spalte. (D) Die proximalen Tubuli bilden durch longitudinales Wachstum in Richtung Medulla den absteigenden und aufsteigenden Ast der Henle-Schleife. (Abb. verändert nach Dressler et al., 2009)

(E) **Entwicklungsstufen der Niere:** 1. Entwicklung des Pronephros aus dem kranialen Teil des nephrogenen Stranges am Ende der dritten SSW. 2. Bildung des Mesonephros; 3. Ausbildung des Metanephros.

Die Differenzierung der Nephrone erfolgt in der Nierenrinde von außen nach innen (Nierenrinde zum Nierenmark). Das bedeutet, dass die ausdifferenzierteren Nephrone weiter innen im medullären Bereich zu liegen kommen und die sich noch proliferierenden Blastemanteile außen in der Nierenrinde befinden.

Die Nephrogenese ist mit der 36. SSW abgeschlossen, danach werden keine neuen Nephrone mehr gebildet (Mitchell et al., 2004; Vanderheyden et al., 2003). Bei Mäusen (*Mus musculus*) hingegen ist dies nicht der Fall. Dort beginnt die Entwicklung des Metanephros um den 10. Embryonaltag und die Nephrogenese setzt sich noch bis zum postnatalen Tag 7 bis Tag 10 fort (Lechner and Dressler, 1997). Auf Grund dieser Tatsache sind Mäuse ein gutes *in vivo* Modell zur extrauterinen Untersuchung der späten Nephrogenese (Potter, 1972).

Wachstumsfaktoren

Eine ganze Reihe von verschiedenen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Niere zu bestimmten Zeitpunkten. Im Detail sind diese Mechanismen noch nicht aufgeklärt. Durch Untersuchungen an mutanten Mäusen konnten einige wichtige an der Nephrogenese beteiligte Gene identifiziert werden.

Für eine korrekte Nierenentwicklung ist die Positionierung der Ureterknospe entscheidend. Sie erfolgt durch das *RET/GDNF/GFR α 1*-System (Dressler, 2006). Da c-ret zum Auswachsen und zur Proliferation der Ureterknospe benötigt wird, wird der Tyrosinkinase-Rezeptor RET im Wolfferschen Gang der Maus als erstes von E8 bis E11,5 und dann noch mal von E13,5 bis E17,5 exprimiert (Horster et al., 1999). Das dazugehörige Signalmolekül GDNF wird nur im metanephrogenen Blastem exprimiert. c-ret selbst wird nur in der Ureterknospe exprimiert. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass Studien an *RET^{-/-}*-Mäusen kein Auswachsen der Ureterknospe zeigen (Schuchardt et al., 1994) und die Tiere somit auch keine Nieren ausbilden. Positive Regulatoren dieses Systems sind unter anderem EYA-1 und SIX-1, die in mutierter Form beim Menschen das BOR-Syndrom auslösen können (Ruf et al., 2004), das mit unterschiedlich ausgeprägten Nierenfehlbildungen einhergeht.

Weitere wichtige Rollen spricht man zum Beispiel den Transkriptionsfaktoren Wt-1, GATA-3 und Pax-2 oder dem sezernierten Signalstoff Wnt-4 (Stark et al., 1994) zu, die in der Niere zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden.

Der Transkriptionsfaktor Wt-1 ist unter anderem dafür erforderlich, damit das Mesenchym kompetent wird und auf die Induktion durch die Ureterknospe reagieren kann. Veränderungen im *WT1*-Gen stehen mit dem Wilms-Tumor im Zusammenhang, der besonders im Kindesalter auftritt (Davies et al., 1999). Die Expression von RET entlang des Wolfferschen Gangs wird von GATA-3 reguliert. Eine Mutation des GATA-3-Gens kann

fehlgerichteten Ureterknospen führen. Der Transkriptionsfaktor Pax-2 wird ausschließlich in dem von der Ureterknospe induziertem Mesenchym exprimiert. Ein Knockout dieses Faktors resultiert in einem nahezu kompletten Fehlen aller Epithelkomponenten (Torres et al., 1995). Für die Induktion der Transformation des Mesenchyms zu Epithelzellen sind unter anderem die Moleküle des WNT-Signalweges notwendig. Studien an Wnt-4 defizienten Mäusen zeigen, dass die Ausbildung von Nierentubuli durch das metanephrische Mesenchym ausbleibt (Stark et al., 1994). Die nicht an der Ureterknospe aggregierten Mesenchymzellen bilden die Stromazellen aus und exprimieren die beiden Retinolsäure-Rezeptoren RAR α und RAR β , sowie den Transkriptionsfaktor Foxd1 (Dressler, 2009). In Nierenkulturen zeigen Retinoide eine wachstumsstimulierende Wirkung. Ein Mangel an Vitamin A kann zu einer Nierenhypoplasie führen (Dressler, 2006). Ebenfalls hyperplastische Nieren zeigen Mäuse mit einer Defizienz der MAP-Kinasen JNK-1, JNK-2 und JNK-3, die für eine kontinuierliche Lumenbildung nach Verschmelzung der Ureterknospe mit dem S-förmigen Vesikel verantwortlich sind (Dressler, 2006). Zudem spielt die Signalkaskade von NOTCH eine Rolle in der Entwicklung des Nephrons. Denn durch Inhibition dieses Signalweges oder eine Mutation in *Notch-1* kommt es zu einer Reduktion in der Anzahl glomerulärer Zellen, sowie der Zellen des späteren proximalen Tubulus in Nierenkulturmodellen (Cheng and Kopan, 2005; Cheng et al., 2003).

1.3 Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein membranständiges Enzym ohne transmembrane Domänen. Es ist das limitierende Enzym bei der Prostaglandinsynthese. Die Umwandlung von Arachidonsäure (AA) in PGH₂ besteht aus zwei verschiedenen Reaktionen. Zunächst wird AA durch die COX zu Prostaglandinendoperoxid (PGG₂) oxygeniert, welches anschließend durch die Peroxidase-Aktivität der COX zu PGH₂ reduziert wird (Garavito et al., 2002).

COX-Enzyme sind homodimere hämenthaltende Glycoproteine mit zwei katalytischen Zentren. Es existieren zwei verschiedenen Isoformen, die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Kujubu et al., 1991; O'Banion et al., 1991; Simmons et al., 1989; Xie et al., 1991). Beide COX sind auf unterschiedlichen Chromosomen in unterschiedlichen Genen kodiert (Smith et al., 1996). Trotzdem weisen sie eine hohe Sequenzhomologie von ca. 60 % auf (Vane et al., 1998). Beide Proteine bestehen aus ca. 600 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 71 kDa (Smith et al., 1996). Die beiden Enzyme sind im Lumen der Zellkernhülle und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die meisten Gewebe sind in der Lage, aus freier AA PGH₂ zu synthetisieren. Der

nächste Schritt zu den Prostanoiden ist jedoch stark Gewebe abhängig, je nach Expression der sekundären Enzyme.

Die COX-1 wird in fast allen Geweben, außer im Herz und Gehirn, konstitutiv exprimiert (DeWitt, 1991). Aufgrund dieser konstitutiven Expression wird vermutet, dass sie für die "housekeeping"-Funktionen, also die Aufrechterhaltung fundamentaler physiologischer Funktionen, verantwortlich ist (Otto et al., 1993; Vane et al., 1998). Zu diesen zählen z.B. der Zellschutz der Magenschleimhaut oder die Kontrolle der Blutplättchenaggregation (Herschman, 1996; Smith, 1992; Smith and Langenbach, 2001). Die COX-2 ist hingegen nur in Gehirn, Nieren und in kleinen Mengen in Lunge, Leber und Magen zu finden. Durch entzündliche Prozesse wird die COX-2 induziert und scheint eine Rolle in pathophysiologischen Prozessen wie bei der Angiogenese, Tumorgenese und Endzündung zu spielen (Hla et al., 1999; Smith and Langenbach, 2001). Gezielter Knockout des COX-2 Gens zeigte eine wichtige basale Funktion für die Nierenentwicklung, den Eisprung und den Geburtsvorgang auf (Dinchuk et al., 1995; Komhoff et al., 2000; Lim et al., 1997; Morham et al., 1995).

In der Niere wird die COX-1 am stärksten im Sammelrohr exprimiert, in geringen Mengen auch in den interstitiellen Zellen, in glomerulären mesengialen Zellen und in den Endothelzellen der Arteriolen (Harris et al., 1994; Yang et al., 1998). COX-2 ist dagegen in der Niere überwiegend in den medullären interstitiellen Zellen und im Cortex im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife sowie in Zellen der Macula Densa exprimiert (s. Abb. 4) (Guan et al., 1997; Hao et al., 1999; Harris et al., 1994). Die Expression von COX-2 kann in diesen Zellen durch verschiedene Arten von Stress induziert werden.

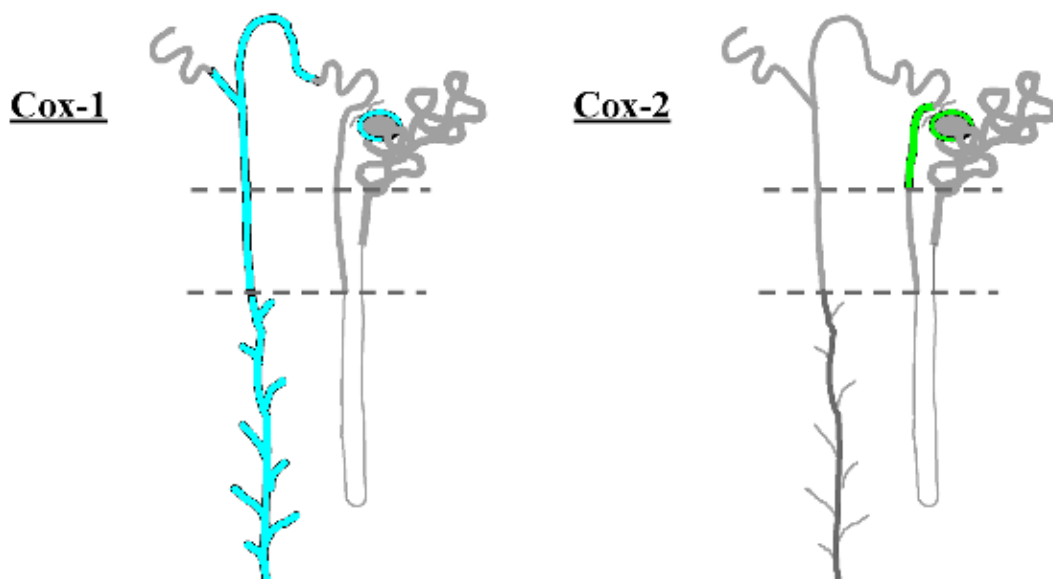


Abb. 4: RNA-Nachweis und Lokalisation von COX-1 (blau) und COX-2 (grün) im Nephron; (Vitzthum et al., 2002).

Die Induktion der COX-2 Proteinexpression konnte von Kömhoff et al. von Tag P0 bis P4 in murinen Nieren beobachtet werden, die anschließend wieder komplett verschwindet (Kömhoff et al., 2000). Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von Zhang et al. an der Ratte, die von P7 bis P28 eine Induktion der COX-2 nachweisen konnten. Auch bei der Ratte ist die Nephrogenese erst zwischen P7 und P14 abgeschlossen (Maric et al., 1997). Zudem wird die COX-2 nicht nur in der adulten Niere konstitutiv exprimiert, sondern auch in der fetalen (Zhang et al., 1997). Bei COX-2^{-/-} konnten renale Missbildungen und Entwicklungsstörungen nachgewiesen werden (Dinchuk et al., 1995), was auf eine COX-2 abhängige Prostaglandinbildung im Zuge der normalen renalen Entwicklung schließen lässt. Ein Fehlen von COX-1 hingegen führt zu keinerlei renalen Fehlentwicklungen (Langenbach et al., 1995). Durch eine Gabe von selektiven COX-2-Inhibitoren (z.B.: SC-236) an trächtige Mäuse und Ratten wird sowohl die Entwicklung des Nierencortex als auch die Größe der Glomeruli beeinträchtigt. Die erhaltenen Phänotypen ähneln dem der COX-2 defizienten Maus. Im Gegensatz hierzu beobachtet man nach Gabe von COX-1-Inhibitoren keine gestörte Nierenentwicklung (Kömhoff et al., 2000).

1.4 Prostaglandine

Prostaglandine gehören zu der Gruppe der Eicosanoide. Diese sind an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt (Ford-Hutchinson, 1985), insbesondere an Entzündungsreaktionen. Prostaglandine werden in den meisten Zellen unseres Körpers hergestellt. Sie können sowohl parakrin als auch autokrin wirksam sein und eine Reihe von Signalwegen aktivieren. Die Prostaglandine werden nur bei Bedarf aus AA metabolisiert und nicht vesikulär in der Zelle gespeichert (Narumiya, 1994; Sugimoto et al., 2000). Nach ihrer Synthese werden die Prostaglandine sofort mittels Prostaglandin-Transporter (PGT) (Kanai et al., 1995) aus der Zelle freigesetzt. Eine Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) oder der Phospholipase C (PLC) setzt aus der Zellmembran AA frei. Durch eines der beiden COX-Enzyme wird die AA zu PGH₂ umgesetzt (Vane et al., 1998).

PGH₂ kann durch bislang drei verschiedene bekannte Enzyme zu Prostaglandin E₂ (PGE₂) synthetisiert werden (Murakami et al., 2002). Die zytosolische PGE₂-Synthase (cPGES) ist funktionell meist an COX-1 gekoppelt und ebenso konstitutiv exprimiert (Tanioka et al., 2000). Zur PGE₂-Synthese benötigt sie Glutathion. Die zweite PGE₂-Synthase ist die mikrosomale PGE₂-Synthase-1 (mPGES-1). Sie ist meist an die COX-2 gekoppelt und ist ebenso induzierbar (Thoren et al., 2003). Die mikrosomale PGE₂-Synthase-2 (mPGES-2) wird konstitutiv exprimiert und ist vermutlich funktionell an beide COX-Isoformen gekoppelt

(Murakami et al., 2003). Neben PGE_2 können noch weitere Prostanoiden durch ihre jeweiligen gewebespezifischen Synthesen wie Prostaglandin D_2 (PGD_2), Prostaglandin F_2 (PGF_2), Prostacyclin (PGI_2) und Thromboxane (TXA_2 , TXB_2) gebildet werden (Coleman et al., 1989; Kennedy et al., 1982).

Die Prostanoiden vermitteln ihre Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsintyp mit sieben transmembranen Domänen (Narumiya and FitzGerald, 2001; Narumiya et al., 1999; Ushikubi et al., 1995). Jedes natürlich vorkommende Prostaglandin besitzt mindestens einen spezifischen Rezeptor (s. Abb. 5).

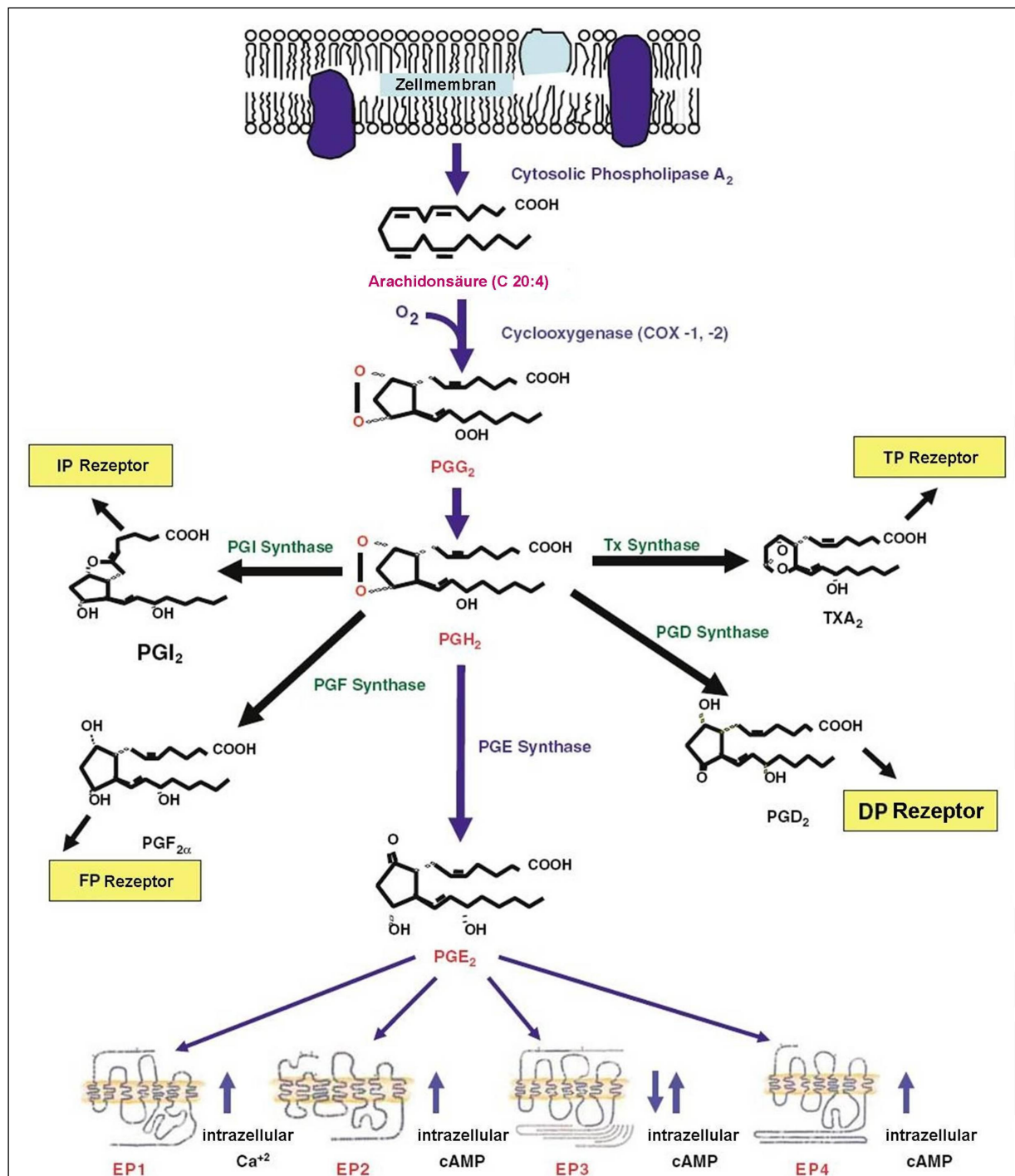


Abb. 5: Prostanoid-Synthese; (Dey et al., 2006)

Die Prostanoidrezeptoren werden entsprechend ihrer Liganden klassifiziert (FP-, IP-, TP-, DP- und EP-Rezeptoren) (Negishi et al., 1993; Sugimoto et al., 2000) und weisen auf Proteinebene eine 20-30 %ige Sequenzhomologie auf. Eine Übersicht ihrer Effekte ist in Abbildung 6 aufgeführt. Der PGE₂ assoziierte EP-Rezeptor spaltet sich in vier verschiedene Subtypen auf, den EP1-, EP2-, EP3- und den EP4-Rezeptor (Breyer and Breyer, 2001; Breyer et al., 2001). Diese Rezeptorsubtypen konnten neben dem Menschen (Narumiya et al., 1999) auch in weiteren Spezies wie zum Beispiel der Maus (Sugimoto et al., 2000), der Ratte (Boie et al., 1997) und dem Hamster (Kiriyaama et al., 1997) nachgewiesen werden. Dabei werden bei Bindung ihres Liganden an die Rezeptoren verschiedene intrazelluläre Transduktionswege in Gang gesetzt. Der EP1-Rezeptor signalisiert über die Bildung von Inositol-3-Phosphat (IP₃) und einer intrazellulären Erhöhung von Calcium (Batshake et al., 1995; Funk et al., 1993; Watabe et al., 1993). Eine Expression des EP1-Rezeptors ist vorwiegend in der Niere und in weitaus geringeren Mengen in der Magenschleimhaut und im Nebennierengewebe zu beobachten. Der EP2-Rezeptor signalisiert über eine intrazelluläre Erhöhung von cAMP (Bastien et al., 1994; Regan et al., 1994) und kann durch Butaprost selektiv aktiviert werden. Die Expressionsmuster des EP2-Rezeptors sind noch nicht vollständig bekannt. Nachgewiesen werden konnte bisher eine EP2-Expression in Uterus, Lunge und Milz sowie eine geringe Expression in der Niere (Boie et al., 1997; Katsuyama et al., 1995; Nemoto et al., 1997; Regan et al., 1994).

Rezeptor	Signalweg	Liganden	Effekte
DP	cAMP↑	PGD	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Erschlaffung der glatten Muskulatur von Gastrointestinaltrakt und Uterus
EP ₁	IP ₃ ↑	PGE, PGF	Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien und Gastrointestinaltrakt
EP ₂	cAMP↑	PGE	Erschlaffung der glatten Muskulatur von Bronchien, Gastrointestinaltrakt und Gefäßen, Blutdrucksenkung
EP ₃	cAMP↓	PGE	Hemmung der Säuresekretion des Magens, verstärkte Uteruskontraktionen in der Schwangerschaft, Hemmung der Lipolyse und Neurotransmitterfreisetzung
EP ₄	cAMP↑		Vermehrte Schleimsekretion des Magens, Offenhaltung des Ductus arteriosus Botalli
FP	IP ₃ ↑	PGF	Uteruskontraktionen
IP	cAMP↑	PGI	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Reninfreisetzung und Natriurese
TP	IP ₃ ↑	TXA, PGD	Thrombozytenaggregation, Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion

Abb. 6: Prostanoid-Rezeptoren und ihre Effekte (Mutschler, 2001)

Der EP3-Rezeptor ist in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, darunter zählen Niere, Uterus, Nebennieren und Magen. Er signalisiert über die Inhibition der intrazellulären cAMP-

Bildung über einen Pertussis-Toxin-sensitiven G_i -Rezeptor gekoppelten Mechanismus. Der EP4-Rezeptor signalisiert wie der EP2-Rezeptor über einen intrazellulären Anstieg von cAMP. Die Expression des EP4-Rezeptor ist in verschiedenen Geweben nachweisbar, so findet man ihn in Thymus, Ileum, Lunge, Milz, Nebennieren und Niere (Breyer et al., 1996b; Honda et al., 1993; Sando et al., 1994).

1.4.1 Prostaglandine in der Niere

Die Niere ist eines der am stärksten prostaglandinsynthetisierenden Gewebe. Prostaglandine modulieren den Blutfluss und regulieren die Urinbildung sowohl auf glomerulärer als auch auf tubulärer Ebene. Das in der Niere vorherrschende PGE_2 , ist vor allem im Nierenmark, aber auch in geringerer Konzentration im Nierencortex zu finden (Bonvalet et al., 1987). Außerdem ist im Cortex der Niere noch PGI_2 und in geringen Mengen TXA_2 nachzuweisen (Farman et al., 1987). PGE_2 und PGI_2 werden unter anderem durch Faktoren induziert, die den renalen Blutfluss verringern (Angiotensin, Katecholamine). Dabei spielt PGE_2 eine Schlüsselrolle im tubulären Transport entlang des gesamten Nephrons (Breyer et al., 2003). Die Expression der PGE_2 -Rezeptoren konnte von Morath et al. in der humanen Niere aufgezeigt werden (Morath et al., 1999). Dabei konnte die Protein-Expression aller vier verschiedenen EP-Rezeptoren entlang des Nephrons nachgewiesen werden. In der Maus wird der EP1- Rezeptor hauptsächlich in den Podozyten und Sammelrohren exprimiert, mit zunehmender Konzentration vom Cortex zur Papille (Batshake et al., 1995; Guan et al., 1998; Sugimoto et al., 1994). Er ist dort vermutlich hauptsächlich an der Hämodynamik und an der Inhibition der Na^+ -Reabsorption beteiligt (Guan et al., 1998; Hebert et al., 1991; Hebert et al., 1998). Durch eine Aktivierung des EP1-Rezeptors steigt der intrazelluläre Calcium-Spiegel an und inhibiert dadurch die Na^+ - und Wasser-Resorption in den Sammelrohren. Dies deutet auf einen natriuretischen und diuretischen Effekt von PGE_2 über den EP1-Rezeptor hin. EP1-Rezeptor Knockout-Mäuse entwickeln eine Hyperreninämie und zudem eine Hypotonie (Audoly L, 1999). Dies ist ungewöhnlich, da der EP1-Rezeptor an ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal gekoppelt ist, was hauptsächlich zur Vasokonstriktion genutzt wird. Denkbar wäre die Modulation der Aktivität eines zweiten vasoaktiven Systems durch den EP1-Rezeptor. Der EP2-Rezeptor ist in der Niere nur schwach exprimiert (Boie et al., 1997; Breyer and Breyer, 2000b; Katsuyama et al., 1995; Regan et al., 1994) und hauptsächlich an der Freisetzung von Renin beteiligt. Er wird in der Macula Densa, in den interstitiellen Zellen sowie in den Blutgefäßen exprimiert (Nasrallah et al., 2007). $EP2^{-/-}$ -Mäuse reagieren auf die Gabe einer Hochsalzdiät mit einer salzsensitiven Hypertension, weshalb vermutet wird, dass der EP2-Rezeptor die Exkretion von Natrium erleichtert und

The diagram illustrates the distribution of prostaglandin synthase (COX) and its products (PGE₂, PGI₂) in the kidney. The main diagram shows the kidney's anatomy with labels for the afferent arteriole, PCT, PST, CTAL, mTAL, CCD, and MCD. It also shows the macula densa and distal convoluted tubule. A detailed inset shows the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) pathway, starting from Angiotensinogen, converted to Angiotensin I by renin, then to Angiotensin II by ACE, which leads to Aldosterone. The RAAS pathway is also linked to COX in the macula densa and the production of PGE₂ and PGI₂.

Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) Pathway:

- Angiotensinogen → (renin) → Angiotensin I
- Angiotensin I → (ACE) → Angiotensin II
- Angiotensin II → Aldosterone

COX and Prostaglandin Synthase Distribution:

- Macula densa:** COX in macula densa
- Afferent arteriole:** dilator (IP, EP2 or EP4) constrictor TP.
- TP and EP4 in glomerulus**
- FP receptors in distal convoluted tubule**
- EP1, EP3, EP4**
- EP3**
- EP2 or EP4 in thin descending limbs**
- Vasodilator: IP, EP2 or EP4 in vasa recta**

PCT: proximaler kortikaler Tubulus; PST: gerader Teil des proximalen Tubulus; cTAL: kortikaler Teil des dicken ascendierenden Schenkel der Henle-Schleife; mTAL: medullärer Teil des dicken ascendierenden Schenkel der Henle-Schleife; CCD: cortikales Sammelrohr; MCD: medulläres Sammelrohr; Quelle: aus Breyer and Breyer, 2001

Eine Defizienz des EP4-Rezeptors zeigt in Mäusen jedoch keinen spezifischen renalen Phänotyp (Fleming et al., 1998; Ushikubi et al., 1998), was vermuten lässt, dass die fehlende Funktion von einem anderen Rezeptor, wie zum Beispiel dem EP2-Rezeptor, kompensiert wird (Breyer and Breyer, 2001). Die Expression des EP4-Rezeptors ist in der Niere hauptsächlich in den Glomeruli (Jensen et al., 2001; Narumiya, 1994), aber auch im distalen Tubulus und im Sammelrohr nachzuweisen (Breyer and Breyer, 2000a). Die renale Funktion des EP4-Rezeptors ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Breyer et al., 1996a; Breyer et al., 1996b; Sugimoto et al., 1994). Doch lässt die Expression im Glomerulus vermuten, dass er an der renalen Hämodynamik und der Reninfreisetzung beteiligt ist (Jensen et al.,

1999). Des Weiteren wird vermutet, dass der EP4-Rezeptor im Sammelrohr bei der Regulation des vasopressinabhängigen Wassertransports den Gegenspieler des EP3-Rezeptors übernimmt (Sakairi et al., 1995). Vergleichbar mit PGE_2 fördert auch PGI_2 die Durchblutung in der Niere und ist ebenso an der Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen beteiligt. Zudem ist PGI_2 in der Lage die Thrombozytenaggregation zu hemmen. Die Konzentrationen von PGI_2 sind sowohl im Cortex als auch in der Medulla jeweils niedriger als die von PGE_2 . Eine Expression des IP-Rezeptors ist in den Glomeruli und der Vasa recta vorzufinden. Des Weiteren ist auch eine mRNA-Expression in der afferenten Arteriole nachweisbar, wo durch Aktivierung des IP-Rezeptors vermutlich die renalen Arteriolen dilatiert und die Reninfreisetzung stimuliert werden (Breyer and Breyer, 2000b).

Auch die Prostanoidrezeptoren TP, FP und DP werden in der Niere exprimiert, über deren renale Funktion ist aber bisher nur wenig bekannt.

Aus all diesen Untersuchungen ist letztendlich jedoch noch nicht bekannt, welche Prostaglandine bei der Nierenentwicklung eine zentrale Rolle spielen. Denkbar wären neben dem PGE_2 auch das Thromboxan oder das Prostacyclin.

1.5 Cyclooxygenase-Knockout-Mäuse

Durch den genetischen Knockout der beiden COX-Enzyme, in Mäusen, konnten deren biologische Mechanismen näher untersucht werden.

$\text{COX-1}^{-/-}$ -Mäuse zeigen eine normale Organentwicklung. Die Niere und auch der Magen der defizienten Mäuse zeigen keinen histologischen oder funktionellen Unterschied zu den Wildtypen (Langenbach et al., 1995). Dies ist überraschend, da in beiden Organen eine starke COX-Aktivität nachweisbar ist. $\text{COX-2}^{-/-}$ -Weibchen sind infertil. Die Eierstöcke sind durch ein Fehlen der Corpora lutea klein, die Follikelreifung ist jedoch normal. Dies deutet auf eine durch COX-2-Inhibition verhinderte Ovulation hin. Die Pathologie homozygoter $\text{COX-2}^{-/-}$ -Mäuse zeigt ganz eindeutig, dass die Auswirkungen des Fehlens dieses Enzyms in schwersten Störungen der Niere bestehen (Morham et al., 1995). Bei Nagern ist die Nierenentwicklung zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig abgeschlossen und setzt sich postnatal über einige Wochen fort. Morham et al. (1995) konnten zeigen, dass die Nieren der Knockout-Tiere kleiner und blasser mit einer granulären Kapseloberfläche waren, im Vergleich zu denen der Wildtypiere. In drei Tage alten $\text{COX-2}^{-/-}$ -Mäusen konnte kein Unterschied in der Nierenhistologie im Vergleich zu Wildtyp beobachtet werden. In sechs Wochen alten COX-2 defizienten Mäusen wurde jedoch eine postnatale Störung in der

Ausreifung der Glomeruli in der subkapsulären nephrogenetischen Zone beobachtet. In dieser Zone werden normalerweise während der postnatalen Zeit neue Nephrone ausgebildet. Durch ein Ausbleiben der Neubildung ergibt sich eine subkapsuläre Zone mit hypoplastischen Glomeruli. Um diesen Wegfall an Glomeruli zu kompensieren, werden vermutlich die vor der Störung gebildeten Glomeruli hyperplastisch. Zudem konnten in den Nieren adulter COX-2^{-/-}-Mäuse Läsionen verschiedenster Ausprägungen festgestellt werden. Die Nephropathien waren unter anderem gekennzeichnet durch einen dünneren Cortex sowie verkleinerte, unreife Glomeruli und Tubuli. Die Anzahl der Glomeruli ist im Vergleich zu den Wildtyptieren geringer. Weitere histologische Auffälligkeiten waren cortikale Bereiche tubulärer Atrophie, tubulärer Dilatation, interstitieller Entzündungen und Fibrose (Morham et al., 1995). Vergleichbare Beobachtungen wurden unabhängig von Dinchuk et al. (1995) gemacht. Die Nieren waren unterentwickelt mit nur wenigen funktionsfähigen Nephronen und einem hohen Anteil an unentwickeltem Mesenchym. Auch hier wurden subkapsulär unreife Glomeruli und fehlgebildete Tubuli gefunden. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit das Vorhandensein corticomedullärer Mikrozysten und medullärer Atrophie beschrieben. Die COX-2-Knockout-Mäuse weisen im Blut einen erhöhten Harnstoff-Stickstoff- und Kreatinin-Gehalt auf, als Zeichen einer eingeschränkten Nierenfunktion. Diese Ergebnisse deuten in der Summe darauf hin, dass die Induktion des metanephrogenen Mesenchyms zu glomerulären und tubulären Strukturen des ausgereiften Nephrons zumindest teilweise COX-2 abhängig ist. Auch schon in der sehr frühen Entwicklung der Niere gibt es Hinweise auf wichtige beteiligte Faktoren. Die Proteine Pax2 und Wnt4 sind unter anderem für die Anregung der Epithelialisierung der Nephronbläschen und somit die Entwicklung der Niere verantwortlich. Dafür sprechen auch Untersuchungen an Wnt4 defizienten Mäusen und Mäusen mit deregulierter Pax2-Expression. Diese zeigen einen ähnlichen Phänotyp mit Auffälligkeiten in der Niere, was auf einen Zusammenhang in der Nierenentwicklung hindeutet (Dinchuk et al., 1995). Höchstwahrscheinlich bestehen aber keine Zusammenhänge zum COX-System bei diesen frühen Expressionseignissen, da Kömhöff et al. gezeigt haben, dass bei Hemmung der COX-2 von E1,5 - E16 keine Schädigung der Nierenentwicklung auftritt (Kömhoff et al., 2000). Des Weiteren weisen homozygote COX-2-Knockout-Tiere eine myokardiale Fibrose beider Ventrikel auf, was darauf hindeutet, dass die COX-2 auch eine herzphysiologische Funktion ausübt. Höchstwahrscheinlich bestehen aber keine Zusammenhänge zum COX-System bei diesen frühen Expressionseignissen, weil Kömhoff et al. gezeigt haben, dass bei Hemmung der COX-2 von E1,5 bis E16 keine Schädigung der Nierenentwicklung auftritt.

Kömhoff et al. (2000) konnten ebenfalls zeigen, dass durch die Gabe eines COX-2-Inhibitors vom Tag der Geburt an bis zum postnatalen Tag 21 ein vergleichbarer Phänotyp in der Niere

wie bei COX-2-Knockout-Tieren induziert wird. Die behandelten Nieren weisen ein geringeres cortikales Volumen auf als unbehandelte. Die Glomeruli sind unreif und ihre Durchmesser kleiner im Vergleich zu unbehandelten. Die subkapsuläre Schicht an Tubuli ist dünner und die Durchmesser geringer als in unbehandelten Tieren. Ob dieser Effekt auf die glomerulären Defekte hin induziert wird oder ob es ein direkter Effekt der COX-2-Inhibition auf das Nephronwachstum ist, ist bisher noch unklar. Tiere, die schon während der Schwangerschaft bis zum postnatalen Tag 21 mit einem COX-2-Inhibitor behandelt wurden, hatten noch kleinere Glomeruli. Stoppte man aber die Gabe des Inhibitors zum Zeitpunkt der Geburt, ist kein Schaden an P21 feststellbar. Dies deutet darauf hin, dass die COX-2 erst nach der Geburt der Maus für die Nephrogenese von Bedeutung ist. An adulten Tieren ist durch die Gabe eines COX-2-Inhibitors ebenfalls kein Schaden in der Niere induzierbar. Die Gabe eines COX-1-Inhibitors hat keinerlei Auswirkungen auf die Nierenentwicklung und Glomeruligröße, was die Beobachtungen an COX-1 defizienten Mäusen bestätigt (Komhoff et al., 2000).

1.6 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Im Zuge der Entwicklung scheint auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine entscheidende Rolle zu spielen. Von Knockout-Untersuchungen weiß man, dass die Nierenentwicklung gestört ist (Oliverio et al., 1997). Das RAAS spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks, des Salz- und des Wasserhaushaltes. Durch Hypovolämie, Natriummangel oder verminderte Nierendurchblutung wird durch Renin-Ausschüttung aus der Niere das System aktiviert (s. Abb. 8). Die Aspartyl-Protease Renin wird in der Niere in den juxtaglomerulären granulären Zellen der afferenten Arteriole gebildet und spaltet das in der Leber gebildete und gespeicherte Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I (ANG I).

Durch das überwiegend in der Lunge vorkommende Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wird ANG I in seine aktive Form, dem Oktapeptid Angiotensin II (ANG II), hydrolysiert. ANG II ist einer der stärksten Vasokonstriktoren und zusätzlich in der Lage, aus der Nebennierenrinde das Hormon Aldosteron freizusetzen. Aldosteron fördert im Bereich des distalen Tubulus die Rückresorption von Na^+ und H_2O und erhöht dadurch das Blutvolumen. ANG II kann über zwei verschiedene 7-transmembrane G-Protein gekoppelte Rezeptoren, dem AT_1 - und AT_2 -Rezeptor, signalisieren (Timmermans et al., 1993). Eine Aktivierung des AT_1 -Rezeptors bewirkt vorwiegend eine Stimulation der Phospholipase C (PLC), die über die Synthese von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) die Freisetzung von intrazellulärem Calcium fördert. Eine weitere Möglichkeit ist eine Stimulation der Phospholipase D (PLD) und

Phospholipase A₂ (PLA₂) Kaskaden, die in der Bildung von Fettsäuren endet, welche eine Vorstufe zur Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen darstellen. Der Großteil der bekannten Wirkungen von ANG II wird vom AT₁-Rezeptor übernommen, wie Vasokonstriktion arterieller Gefäße, Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, Aktivierung des sympathischen Nervensystems oder Vermittlung von Zellwachstum. Des Weiteren übt ANG II über den AT₁-Rezeptor eine negative Feedbackkontrolle auf die Renin-Ausschüttung aus. Im Gegensatz dazu sind die Funktionen des AT₂-Rezeptors noch weitgehend unbekannt. Seine stärkste Expression zeigt der AT₂-Rezeptor am Ende der Embryonalentwicklung, er wird aber auch in Gehirn, Nieren und Nebennieren, Ovarien und Uterus exprimiert. Eine Aktivierung des AT₂-Rezeptors stimuliert unterschiedliche intrazelluläre Mechanismen mit Involvement verschiedener Tyrosin- und Serin/Threonin Phosphatasen, zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und PLA₂ (de Gasparo, 2002).

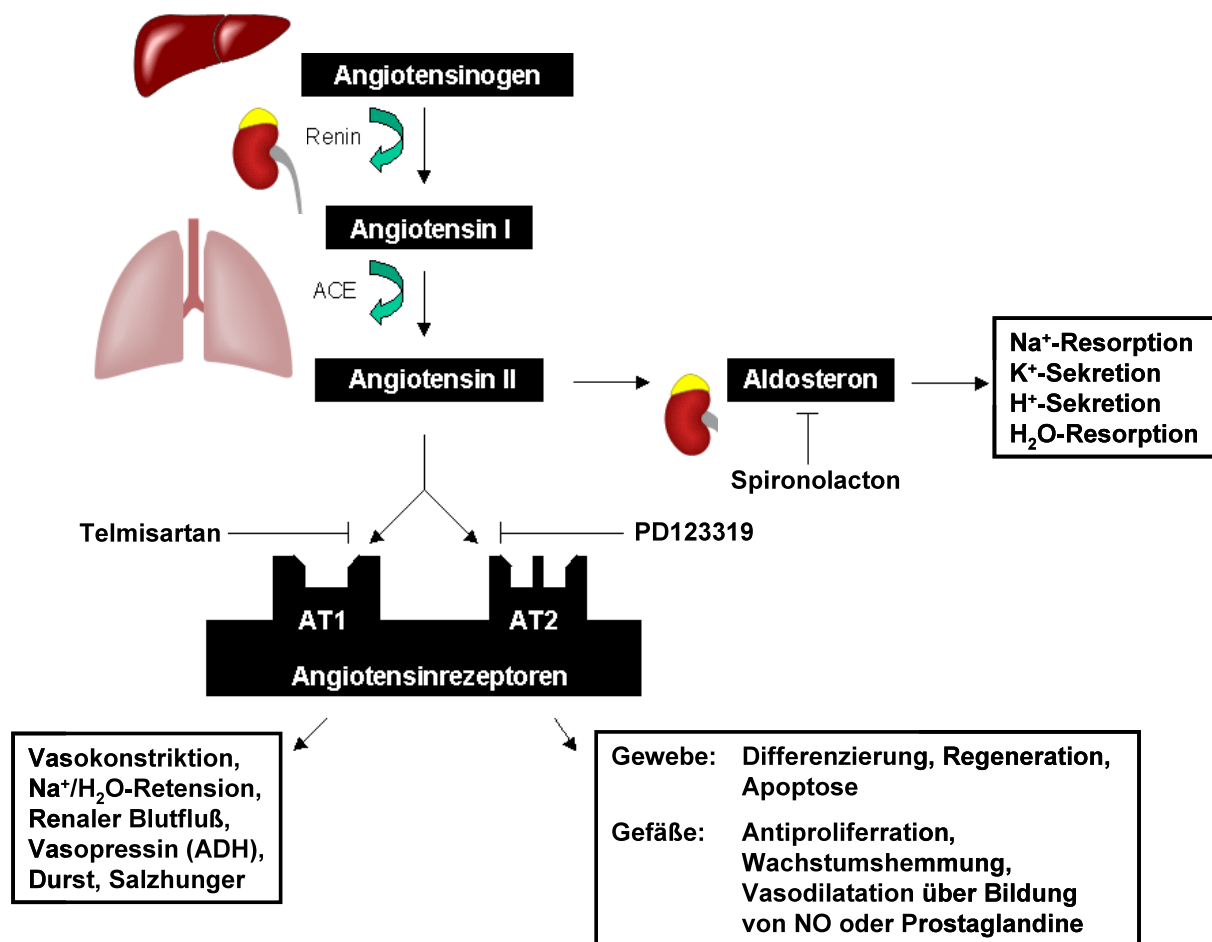


Abb. 8: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Durch Abfall des Blutdrucks wird Renin aus der Niere freigesetzt und spaltet Angiotensinogen in Angiotensin I ab. Dies wird wiederum von dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in Angiotensin II umgewandelt. Durch das Binden an einen der zwei Angiotensin-Rezeptoren können sich unterschiedliche Wirkungen entfalten, wie z.B. die Verengung der feinen Blutgefäße zur Erhöhung des Blutdrucks.

Dem AT₂-Rezeptor scheint eine Art Gegenspielerfunktion zum AT₁-Rezeptor zuzukommen, da er z. B. die vasopressive Funktion von ANG II durch den AT₁-Rezeptor antagonisiert. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass der AT₂-Rezeptor in Apoptose und Wachstumsinhibition involviert ist (Horiuchi et al., 1999). Beide ANG II-Rezeptoren werden in der Niere exprimiert. Dabei ist der AT₁-Rezeptor in der Niere in vaskulären, glomerulären und tubulären Elementen sehr weit verbreitet. Lokalisiert werden konnte der AT₁-Rezeptor unter anderem in Glomeruli in den mesangialen Zellen und Podozyten, afferenten und efferenten arteriellen glatten Muskelzellen, renalen medullären interstitiellen Zellen (RMICs) in der inneren und äußeren Medulla, der Apikal- und Basolateralmembran des proximalen Tubulus, dicken aufsteigenden Ast (TAL) Epithelien, Macula densa Zellen, distalen Tubulus und im Cortex des Sammelrohrs (Harrison-Bernard et al., 1997; Paxton et al., 1993; Zhuo et al., 1994). Der AT₂-Rezeptor hingegen wird weitaus weniger stark exprimiert, überwiegend während der Entwicklung und ist nach Abschluss der Nephrogenese nur schwer nachzuweisen (Aguilera et al., 1994; Norwood et al., 1997).

Knockout	Phänotyp
AT _{1A} -Knockout	Reduktion des systolischen Blutdruckes und minimaler Blutdruckanstieg auf Angiotensin II (Ito et al., 1995; Oliverio et al., 1997) gering ausgeprägte pränatale Letalität und renale Entwicklungsdefekte (Oliverio et al., 1998)
AT _{1B} -Knockout	keine Entwicklungsdefekte und normale Blutdruckregulation (Chen et al. 1997)
AT _{1A1B} -Knockout	postnatale Letalität mit renalen und kardialen Entwicklungsdefekten und fehlende Blutdruckantwort auf Angiotensin II (Oliverio et al., 1998; Tsuchida et al., 1998)
AT ₂ -Knockout	verstärkte Blutdruckantwort auf Angiotensin II-Infusionen bei normalen (Hein et al., 1995) bzw. erhöhten (Ichiki et al., 1995) basalen Blutdruckwerten

Tabelle 1: Transgene Maus-Modelle von Angiotensin II AT-Rezeptoren

Nager besitzen im Gegensatz zum Menschen zwei verschiedene AT₁-Rezeptor-Subtypen, den AT_{1A}-Rezeptor und den AT_{1B}-Rezeptor. Die beiden Subtypen sind vermutlich durch Genduplikation entstanden (Yoshida et al., 1992) und variieren in ihrer Gewebeexpression trotz weitgehender Homologie erheblich (Kitami et al., 1992). Bei AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor Doppelknockout-Mäusen zeigen sich renale und kardiale Entwicklungsstörungen, bis hin zur postnatalen Letalität (vgl. Tabelle 1). Bei Defizienz des AT_{1A}-Rezeptors zeigt sich eine leichte pränatale Letalität und renale Entwicklungsdefekte, während ein AT_{1B}-Rezeptor-Knockout keinerlei Entwicklungsdefekte nach sich zieht (Oliverio et al., 1998).

1.6.1 Cyclooxygenasen und die Regulation von Renin

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass PGE_2 und PGI_2 an der Regulation von Renin beteiligt sind. Dabei kommt es wahrscheinlich durch eine Aktivierung von EP2-, EP4- und möglicherweise auch IP-Rezeptoren zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in den juxtaglomerulären Zellen (Breyer et al., 1998; Friis et al., 2005). Gebildet wird Renin hauptsächlich in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates in der Niere. Die Endopeptidase setzt als Schlüsselenzym die Kaskade des Renin-Angiotensin-Systems in Gang (s. Abb. 8). Auch die COX-2 ist in der Lage das Renin-Angiotensin-System zu aktivieren und wird umgekehrt durch ein aktives Renin-Angiotensin-System gehemmt. Aus diesem Grund ist es möglich, dass COX-2-Inhibitoren die Reninproduktion und Reninsekretion hemmen können (Traynor et al., 1999). Die cortikale COX-2-Expressionsrate lässt sich durch eine Niedrigsalzdiät erhöhen und durch eine Hochsalzdiät reduzieren (Hocherl et al., 2002).

Als primärer Regelmechanismus für die Reninsekretion und den tubuloglomerulären Feedback (TGF) dient die Macula densa. Dafür ausschlaggebend ist die tubuläre NaCl-Konzentration am distalen Ende der Henle-Schleife. Bei hypoosmolarem Harn kommt es zu einer Reninausschüttung aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparats. Dagegen kommt es bei einer erhöhten Salzkonzentration (hyperosmolar) zu einer Hemmung der Reninfreisetzung. Dazu werden je nach Bedarf in den TAHL Zellen die Anzahl der $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) erhöht oder erniedrigt (Persson et al., 1991). Auch die COX-2 ist wahrscheinlich an der Regulation des NKCC2 beteiligt, ihre Expression steigt mit abnehmender intrazellulärer Cl^- -Konzentration. Ebenso führt eine Blockierung des Renin-Angiotensin-Systems durch Verabreichung von ACE-Hemmern, Angiotensin II-Blockern oder AT_1 -Rezeptorantagonisten zu einer erhöhten Expression von COX-2 in der Macula densa. Auch die beiden Angiotensin II-Rezeptoren sind an der Regulation des NKCC2-Rezeptors beteiligt. Durch eine Aktivierung des AT_1 -Rezeptors wird Na^+ rückresorbiert, und die Aktivität des NKCC2 steigt an. Bei einer Aktivierung des AT_2 -Rezeptors dagegen wird Na^+ ausgeschieden, und die Aktivität des NKCC2 geht zurück.

1.7 Fragestellungen

Aus dem derzeitigen Stand der Forschung ergeben sich Fragen, die ich mit der vorliegenden Arbeit versuchen möchte zu beantworten. Es gibt Beweise, dass die COX-2 Expression und Aktivität wichtig sind, um eine normale renale Entwicklung in Mäusen zu gewährleisten. Das dabei beteiligte sekundäre Prostanoidsystem und das exakte Zeitfenster für den Bedarf an COX-2 sind jedoch noch nicht im Detail geklärt. Die bisherigen Untersuchungen haben zwar gezeigt, dass die COX-2 eine Rolle in der Nierenentwicklung spielt, jedoch gibt es bisher keine Hinweise auf die Regulation der postnatalen COX-2-Expression. Zwar ist bekannt, dass da eine Induktion stattfindet, aber es gibt noch keine Befunde darüber, welches die Auslöser der Induktion in diesen ersten Tagen sind. Eine denkbare Möglichkeit zur postnatalen Induktion der COX-2-Expression stellen z.B. die Glucocorticoide dar. Diesem Ansatz sollte in der Arbeit, mittels postnataler Behandlung von Mäusen mit dem Glucocorticoid Dexamethason nachgegangen werden. Daran schließt sich die ebenfalls ungeklärte Frage an, was die induzierte COX-2 und Prostaglandine bewirken. Vorversuche konnten bereits zeigen, dass PGE₂ der Hauptmetabolit ist. Was zu der Frage führt, was für eine Funktion den PGE₂-Synthasen hier an dieser Stelle eventuell zukommt. Weiterhin weisen die aus adulten Mäusen gewonnenen Daten darauf hin, dass PGE₂ über die Rezeptoren EP2 und EP4 das RAAS aktivieren kann. Um dieser Frage weiter nachzugehen, wurden alle Prostanoid-Rezeptoren Knockout-Mäuse auf Wachstums- und Nierenentwicklungsstörungen untersucht. Zudem sollte über die Blockade verschiedener Komponenten des RAAS die Auswirkungen auf die Nierenentwicklung getestet werden. Da das RAAS an der Regelung des Salzhaushaltes beteiligt ist, war es weiter von Interesse, ob schon ein Unterschied in der Salzkonzentration eine Veränderung in der Nierenentwicklung nach sich zieht oder eine Blockade des NKCC2 ebenfalls eine Nierenentwicklungsstörung zur Folge hat.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

7500 Fast Real-time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt (D)
Accu-Jet, Pipettierhilfe	Brand, Wertheim (D)
Brutschrank	Heraeus, Hanau (D)
Deckgläser:	Waldemar Knittel GmbH, Braunschweig (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Finnpipette Digital	Thermo, Langenselbold (D)
Laborzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg (D)
Lichtmikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf (D)
Mastercycler TGradient	Biometra, Göttingen (D)
Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach (D)
MicroAmp Fast Optical 96-well	Applied Biosystems, Darmstadt (D)
Mikrotom:	Rotationsmikrotom RM2135, Leica Instruments, Nussloch
Mikrotomklingen:	Histoknife H, Heraeus-Kulzer; Werheim/Ts. (D)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Mini-Transblot-Cell	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Multipette	Eppendorf, Hamburg (D)
Nano-Drop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (D)
Objektträger:	Super Frost, Menzel GmbH&Co KG, Braunschweig (D)
Orion Aplus™ pH Meter	Thermo Fischer Scientific, Oberhausen (D)
Ofen	Hybaid, Teddington (UK)
Photomikroskop:	Axioskop, Zeiss (Oberkochen)
Pipetten, diverse Größen	Gilson, Middleton, WI (USA)
PowerPac Basic	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Polytron PT 1200	Kinematica AG; Luzern (CH)
Präparationsbesteck:	Aesculap, Tuttlingen; (D)
Sonifier S-250	BRANSON, Danbury, CT (USA)

Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach (D)
Systemmikroskop:	Leica DM LS
Thermomixer compact®	Eppendorf, Hamburg (D)
UV-Meter Gel Doc® (Geldokumentationssystem)	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach (D)
Waage	Kern & Sohn, Balingen-Frommern (D)
Wasseraufbereitungsanlage (Milly-Q Water)	Millipore, Schwalbach (D)
Wasserbad:	Leica Instruments, Nussloch (D)

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Biorad (München), Roche (Mannheim), Amersham Pharmacia (Freiburg) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt).

2.1.3 Verbrauchsstoffe

Blotting Papier	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
EDTA-Mikroprobengefäß	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht (D)
Einbettkassetten	Sanowa, Leimen (D)
Kanülen, 0,3 x 12 mm	B. Braun, Melsungen (D)
Nitrocellulosemembran	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettenspitzen, diverse Größen	Thermo Fischer Scientific, Oberhausen (D)
Reagiergefäße (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg (D)

2.1.3.1 Reaktionskits

Absolute QPCR ROX Mix	ABgene, Surrey (UK)
Absolute QPCR SYBR Mix	ABgene, Hamburg (D)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Langenselbold (D)
ECL Detection System	GE Healthcare, Freiburg (D)
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden (D)
Prostaglandin E ₂ EIA Kit - Monoclonal	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (USA)
VECTASTAIN Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA)

2.1.3.2 Antikörper

Antikörper für Immunhistochemie:

Antigen	Verdünnung	Firma
PCNA	1 : 50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
F4-80	1 : 50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)

Antikörper Western Blot:

Antigen	Verdünnung	Firma
mPGES-1	1 : 5000	AgriSera, Vännäs (S)
mPGES-2	1 : 2000	Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)
cPGES	1 : 50	Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)

2.1.3.3 Größen- und Molekulargewichtsstandards

DNA-Ladder Mix	Peglab, Erlangen (D)
Precision Plus Protein TM Standards	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit gefiltertem Reinstwasser (Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water, Fa. Millipore), im Folgenden als H₂O bezeichnet, hergestellt.

Blocklösung für WB: 5 % Milchpulver angesetzt in PBS

Ethidiumbromidlösung: 0,5 mg/l in H₂O

Eosin:	1: 100 in H ₂ O verdünnen 2 Tropfen Essigsäure
Gewebepuffer:	50 mM Tris pH 7,5 1 mM Phenol Proteasecocktail
Gewebelysepuffer (SDS-PAGE):	50 mM Tris pH 7,5 0,1 % Triton X Proteasecocktail
Ladepuffer für Agarosegele:	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol FF 15 % Ficoll (Typ 400) in TE-Puffer gelöst
WB-Lysepuffer:	50 mM Tris pH 7,8 0,1 % Triton-X-100 Proteinase Inhibitor Set I 40 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau
PBS (1x):	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,77 g/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0,25 g/l KH ₂ PO ₄ in H ₂ O pH auf 7,4 einstellen
PBST:	in PBS 0,1 % Tween20 lösen
Schwanz-Lyse-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH auf 8,5 einstellen); 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl
SDS-Probenpuffer (4-fach):	100 mM Tris pH 7,4 8 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 40 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer (10x):	25 mM Tris pH 8,3 200 mM Glyzin 0.1 % (w/v) SDS

Stripping Puffer:	100 mM NaOH 2 % SDS 0,5 % DTT
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris 0,5 M EDTA pH 8 0,57 % Eisessig pH auf 8,5 einstellen
TE-Puffer:	1 M Tris pH 8 0,5 M EDTA pH 8
TN-Puffer:	50 mM Tris pH 7,4 100 mM NaCl
TNT-Puffer:	0,1 % Tween 20 in TN- Puffer
(lower) Tris-Puffer 4x	1,5 M Tris, pH 8
(upper) Tris-Puffer 4x	0,5 M Tris, pH 6,8
Western Blot-Puffer:	50 mM Tris pH 8,3 190 mM Glyzin 20 % (v/v) Methanol

2.1.5 Untersuchte Substanzen

Verwendete Substanzen wurden in den angegebenen Lösemitteln gelöst und in den im Folgenden angegebenen Konzentrationen verabreicht.

Wirkstoff	gelöst in	Konzentration [mg/kgKG/d]
AH 6809	DMSO	8
Dexamethason	DMSO	0,1
PD123319	DMSO	10
SC-236	DMSO	10
SC-560	DMSO	10
Spironolacton	DMSO	10
Telmisartan	DMSO	0,25; 0,4; 0,5
Furosemide	H ₂ O pH 8	10; 30
ONO-AE1-259-01	MetOH	0,2
ONO-AE1-329	MetOH	0,2

2.1.6 Oligonukleotide

mCOX1_for	5´ –	GTG GCT ATT TCC TGC AGC TC	– 3´
mCOX1_rev	5´ –	CAG TGC CTC AAC CCC ATA GT	– 3´

mCOX2_for	5´ –	CCC CCA CAG TCA AAG ACA CT	– 3´
mCOX2_rev	5´ –	CTC ATC ACC CCA CTC AGG AT	– 3´

mβ-actin_for	5´ –	GCT ACA GCT TCA CCA CCA CA	– 3´
mβ-actin_rev	5´ –	AAG GAA GGC TGG AAA AGA GC	– 3´

m-Renin_for	5´ –	ATG AAG GGG GTG TCT GTG GGG TC	– 3´
m-Renin_rev	5´ –	ATG TCG GGG AGG GTG GGC ACC TG	– 3´

RT-mPGES1_for	5´ –	ACA GGC CAG ATG AGG CTG CGG AA	– 3´
RT-mPGES1_rev	5´ –	TCT CCA TGT CGT TGC GGT GGG CT	– 3´

RT-mPGES2_for	5´ –	TTT GGG GCT GTG GAG GCT GCC AT	– 3´
RT-mPGES2_rev	5´ –	ACC CAC GGC TGT CAC CCA CTT GT	– 3´

RT-cPGES_for	5´ –	ATT TTG CTG CGT ACA CAG CCG CC	– 3´
RT-cPGES_rev	5´ –	TCG GCC TCG ATG CCC AGA ATG CAC	– 3´

Primer zur Genotypisierung:

COX1-Primer	Forward	5´ – AGG AGA TGG CTG CTG AGT TGG	– 3´
	Reverse	5´ – AAT CTG CTT TCT GAG TTG CC	– 3´
	Neo	5´ – GCA GCC TCT GTT CCA CAT ACA C	– 3´

COX2-Primer	Forward	5´ – ACA CAC TCT ATC ACT GGC ACC	– 3´
	Reverse	5´ – TCC CTT CAC TAA ATG CCC TC	– 3´

EP1-Primer	Forward	5´ – GCG GAG AGT CCG GCT AGA GAA G	– 3´
	Reverse	5´ – TGA GCC TAG CGG ATG AGG CAG G	– 3´
	Neo	5´ – ATG ACA AGA CGC TGG GCG GGG T	– 3´

EP2-Primer	Forward	5´ – CTG GCC ATT ATG ACC ATC ACC TTC GCC	– 3´
	Reverse	5´ – CTG AGC AAC ACC CAT GTT TCT ATC CTG G	– 3´

EP3-Primer	Forward	5´ – TGC CGA ATA TCA TGG TGG AAA ATG GCC G	– 3´
	Reverse	5´ – AAA GTG ACT AGC ACC CAG AAT TCC TGC C	– 3´
	Neo	5´ – GAG TCC TCC ACT TTG GTG TAC ACA GTA C	– 3´

EP4-Primer	Forward	5' – TCT ACT TGC TCC CAG TGG ACA TAC ATG G	– 3'
	Reverse	5' – GAA CAG ACT CCT GAA CTG GGT ATG GTT C	– 3'
	Neo	5' – TGC CGA ATA TCA TGG TGG AAA ATG GCC G	– 3'
IP-Primer	Forward	5' – GTA TCT TTC AGT ACC TGA GGA	– 3'
	Reverse	5' – GAG CAG AAA AAT TCC CAG AGG	– 3'
	Neo	5' – TGA CCG CTT CCT CGT GCT TTA	– 3'
FP-Primer	Forward	5' – GCC CAT CCT TGG ACA CCG AGA TTA TC	– 3'
	Reverse	5' – AGA GTT GGC AAG CTG TGA CTT CGT CT	– 3'
	Neo	5' – TGA TAT TGC TGA AGA GCT TGG CGG CG	– 3'
TP-Primer	Forward	5' – ACT TTG TTG CAG ACA CCA CCT GTC	– 3'
	Reverse	5' – AAG CTT GGG TTT CAG GGA CCT–	– 3'
	Neo	5' – TGA TAT TGC TGA AGA GCT TGG GGG CGA	– 3'
DP1-Primer	Forward	5' – TCG GTC TTT TAT GTG CTC GTG	– 3'
	Reverse	5' – GGA TCA TCT GGA TGA AAC ACC	– 3'
	Neo	5' – CCC GTG ATA TTG CTG AAG AGC	– 3'

2.1.7 Versuchstiere

Es wurden C57/BL6J Mäuse von der Firma Jackson Laboratories (USA) verwendet, die in der Tierhaltungsanlage des Universitätsklinikums Frankfurt weitergezüchtet wurden.

COX-1^{-/-}-Mäuse und COX-2^{-/-}-Mäuse wurden aus eigener Zucht verwendet. Zuchtpaare wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Robert Langenbach (National Institute of Environmental Health Sciences/ NC, USA) zur Verfügung gestellt.

Prostanoid-Rezeptoren Knockout-Mäuse (EP1^{-/-}, EP2^{-/-}, EP3^{-/-}, EP4^{-/-}, DP1^{-/-}, IP1^{-/-}, FP1^{-/-} und TP1^{-/-}) entstammten der eigenen Zucht. Diese Mäuse wurden ursprünglich von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Shuh Narumiya (Universität Kyoto/ Japan) (Hizaki et al., 1999; Kabashima et al., 2003; Matsuoka et al., 2000; Murata et al., 1997; Segi et al., 1998; Sugimoto et al., 1997; Ushikubi et al., 1998) generiert und unserer Arbeitsgruppe zur weiteren Zucht zur Verfügung gestellt.

Swiss Webster Mäuse (CFW) wurden von der Firma Charles River bezogen. Die mPGES-1^{-/-} Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe PD Dr. Klaus Scholich (Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Die Versuchstiere wurden bei einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus in IVC-Haltung mit Standardfutter und Trinkwasser ad libitum bei 21 ± 2 °C gehalten. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte routinemäßig durch PCR-Analyse.

Die Durchführung der Tierversuche wurde durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Antragsnummer: F143/42). Der Umgang mit Tieren erfolgte gemäß den Ethikvorschriften von Helsinki.

2.1.8 Software

Prism 4	GraphPad Software, San Diego (CA; USA)
QuantityOne [®] -Software	Biorad, München (D)
Image J	Freeware (http://rsbweb.nih.gov/ij/)
Office	Microsoft [®]
SigmaPlot	Systat Software GmbH, San José (CA; USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Behandlung der Mäuse

Der Tag der Geburt wurde als postnataler Tag 0 (P0) definiert. Den neugeborenen Mäusen wurde ab dem postnatalen Tag 1 (P1) bis zum postnatalen Tag 7 (P7) die entsprechenden Substanzen subcutan (s.c.) in eine Hautfalte zwischen die Schulterblätter und danach ab dem postnatalen Tag 8 (P8) bis zum postnatalen Tag 20 (P20) intraperitoneal (i.p.) gespritzt.

Das zu injizierende Volumen wurde möglichst klein gehalten und dem Körpergewicht angepasst, um Volumeneffekte zu vermeiden. Die Volumina und Konzentrationen der entsprechenden Substanzen richtete sich nach aufgeführtem Schema (s. Tab. 2).

Alle verwendeten Substanzen wurden in DMSO gelöst und die Stammlösungen wurden immer frisch zu den jeweiligen Konzentrationen verdünnt. Die Injektion der Tiere erfolgte alle 24 h mittels einer Insulinspritze täglich gegen 12:00 Uhr.

Tag	Gewicht [g]	Menge [μ l]
P0		-
P1	2	5
P2	2	5
P3	2	5
P4	3	5
P5	3	5
P6	3	5
P7	4	5
P8	4	5
P9	5	7,5
P10	5	7,5
P11	6	7,5
P12	6	7,5
P13	6	7,5
P14	6	7,5
P15	7	10
P16	7	10
P17	7	10
P18	7	10
P19	8	10
P20	8	10
P21	8	-

Tabelle 2: Übersicht über Gewicht und gespritzte Volumina abhängig vom Alter der Mauspups

Gewinnung von Spontanurin

Zur Gewinnung von Spontanurin wurden die Mäuse täglich in der Hand aufgespannt und durch leichtes “Bauchkitzeln” zur Blasenentleerung animiert. Der Urin wurde in einem 500 μ l Eppendorf-Cup aufgefangen und sofort auf Eis gehalten. Gelagert wurden die Urine bei - 80 °C.

Präparation der Mäuse

Die Präparation der Tiere erfolgte an Tag P21. Hierzu wurden die Tiere zunächst mit Isofluran (Forene[®]) durch Inhalation narkotisiert und anschließend durch CO₂-Inhalation getötet. Die Tiere wurden gewogen und anschließend auf dem Rücken liegend auf einer Styroporplatte mit Kanülen an ihren Extremitäten fixiert. Nach dem Öffnen des Bauchraumes wurde die Bauch-Aorta durchtrennt, um ein Ausbluten der Nieren zu gewährleisten. Das Mischblut wurde gesammelt und in ein EDTA-Röhrchen gegeben. Die blutleeren Nieren wurden nacheinander aufgesucht, entnommen und gewogen. Zusätzlich wurde noch das

entblutete Herz entnommen. Die entnommenen Organe wurden gewogen und entsprechend fixiert.

Fixieren der Organe

Die entnommenen Nieren wurden sofort in der Mitte der Länge nach geteilt und je eine Hälfte der linken sowie rechten Niere wurde in 4 % Paraformaldehyd für 24 h fixiert. Die andere Hälfte der rechten Niere wurde in Carnoy'scher Lösung ebenfalls für 24 h fixiert. Die andere linke Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Die in 4 % Paraformaldehyd fixierten Nieren wurden am nächsten Tag in 70 % Ethanol umgesetzt. Die in Carnoy'scher Lösung fixierten Nieren wurden in 100 % Ethanol überführt.

Histologie

Die linken, in 4 % PFA fixierten Nierenhälften wurden durch eine aufsteigende Ethanolreihe (je 1 h 70 %, 80 %, 95 % und 100 % ETOH) und Xylol zunächst schrittweise dehydriert. Danach wurden die Nierenhälften in Einbettkassetten gegeben und in flüssigem Paraffin für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Nierenhälften auf den Schnittflächen liegend in eine Gießvorrichtung platziert und diese in Paraffin eingebettet. Zur schnelleren Aushärtung wurden die Blöckchen auf Eis gegeben. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zum Strecken in ein 55 °C Wasserbad gegeben und anschließend auf Objektträger aufgezogen und zum Trocknen über Nacht in einen 37 °C Brutschrank gestellt.

Anschließend wurden die Paraffinschnitte durch Inkubation von je zweimal 5 min Xylol und 2 min Methanol entparaffiniert und durch das Überführen in Wasser wieder hydriert. Die Schnitte wurden schließlich in den jeweiligen Färbelösungen gefärbt.

Um glomeruläre Veränderungen des Nierengewebes beurteilen zu können, wurden Paraffinschnitte zur besseren Übersicht mittels Hämatoxilin und Eosin nach Mayer gefärbt (Lillie, 1965; Mayer, 1896). Bei der HE-Färbung werden die Zellkerne durch den basischen Farbstoff Hämatoxilin blau angefärbt und das Cytoplasma durch den sauren Farbstoff Eosin rot angefärbt. Zunächst wurden die Paraffinschnitte durch Inkubation von je zweimal 5 min Xylol und 2 min Methanol entparaffinisiert und wieder rehydriert durch Überführen in Wasser. Die gewässerten Schnitte wurden für 40 sec in Hämatoxylin inkubiert und danach für 2 min

unter fließendem Wasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte für 20 sec mit Eosin gegengefärbt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 1 min 70 %, 80 %, 90 % und 100 %) wieder dehydriert und in Xylol überführt. Die Schnitte wurden nun mittels Entellan blasenfrei und luftdicht unter Deckgläschen eingedeckt.

Die Färbung mit Sirius-Red dient der Sichtbarmachung von Kollagenfasern (Junqueira et al., 1979; Puchtler et al., 1973). Die Kollagenfasern werden bei dieser Färbung rot dargestellt, Muskelfasern und Cytoplasma werden gelb angefärbt.

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 60 min mit Sirius Red Lösung inkubiert und anschließend zweimal mit 0,01 N HCl gewaschen und in Leitungswasser gespült. Danach wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe und Xylol dehydriert, sowie luftblasenfrei und luftdicht mit Entellan unter Deckgläschen eingedeckelt.

Immunhistologie

Die in der Arbeit verwendete Immunfärbetechnik basiert auf der Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al., 1981). Bei dieser Methode macht man sich die hohe Affinität von Avidin und Biotin zueinander zunutze. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Zuerst wird dabei an das Protein von Interesse ein Primärantikörper gebunden. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet dann an diesen. In einer separaten Reaktion werden Avidin und Biotin in einem Verhältnis so gemischt, dass nicht alle Bindestellen des Avidins besetzt sind. Dieser mit Peroxidase konjugierte Avidin-Biotin-Komplex lagert sich dann mit seinen freien Avidin-Bindestellen an den biotinylierten Sekundärantikörper an. Mittels eines Chromogens wird die Peroxidase des Komplexes sichtbar gemacht. In dieser Arbeit kam das Nachweissystem Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories; USA) zum Einsatz. Als Substratchromogen diente hier AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol), das unter Oxidation ein rotes Farbprodukt ausbildet.

Hierzu wurden Paraffinschnitte verwendet, die, wie für die Histologie beschrieben, auf Objektträger gebracht und entparaffiniert wurden. Die Schnitte wurden mit kaltem Aceton (4 °C) fixiert und in Puffer transferiert. Falls erforderlich, wurden die Schnitte vorher zur Antigenfreilegung in einer Küvette mit 1:10 verdünnter DAKO Target Retrieval Solution für 20 min im Wasserbad gekocht.

Um endogene Substrate und Peroxidasen zu eliminieren, wurden die Schnitte zu Beginn mit 0,3 % H_2O_2 in 0,3%igem Serum für 5 min inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte für 20 min ein Blockierungsschritt mit 0,3 %igem Serum und für 30 min die Inkubation mit dem Erstantikörper. Es folgte nach dreimaligen Waschen mit PBS eine

30 minütige Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 30 min mit ABC-Reagenz inkubiert und wieder mit PBS gewaschen. Angefärbt wurde mit AEC und gegengefärbt mit Hematoxylin QS. Durch Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte abschließend gebläut und mit Aquatex unter einem Deckgläschen eingedeckelt.

Mikroskopie

Pro Versuchsreihe wurden jeweils die Nieren von drei Tieren analysiert. Hierzu wurden zwei 4 μm dicke Nierenschnitte ausgewertet, die mindestens 40 μm voneinander entfernt waren. Die Schnitte wurden mikroskopiert und bei 200 facher Vergrößerung wurde der gesamte Cortex photographiert. Anschließend konnten die Bilder mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware "Image J" vermessen werden.

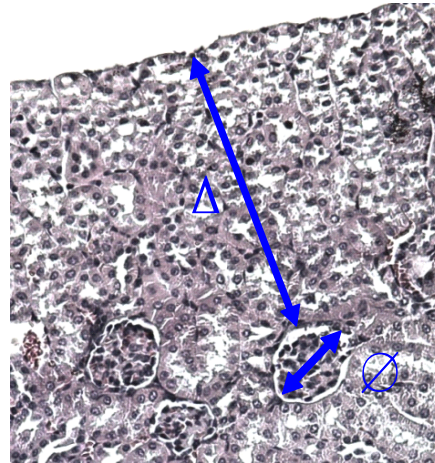
Histomorphologische Auswertung

Folgende Parameter dienen der histomorphologischen Beschreibung der Nephrogenese:

- Durchmesser der Glomeruli
- cortikale Dicke (Abstand der Glomeruli zum cortikalen Rand)
- relative Häufigkeit der Glomeruli im Bereich von 78 μm
- relative Größenverteilung der Glomeruli
- Summe der Größenhäufigkeitsprodukte

Alle pro Tier gemessenen Durchmesser wurden gemittelt. Zur Bestimmung des Cortexwachstums diente der Parameter der cortikalen Dicke (s. Abb. 9). Diese setzt sich zusammen aus dem Mittelwert der gemessenen Durchmesser plus den geringsten gemessenen Abstand eines Glomerulus pro Tier. Alle Werte in diesem Bereich wurden gemittelt, dies ergab die cortikale Dicke. Der 78 μm Bereich entspricht ungefähr der cortikalen Dicke bei Wildtypmäusen. Zur Bestimmung der relativen Häufigkeit von Glomeruli in diesem Bereich (78 μm) wurden alle gemessenen Durchmesser in diesem Bereich gezählt und mit der Gesamtanzahl ins Verhältnis gesetzt. Um die relative Verteilung der Glomeruligrößen zu bestimmen, wurde der Bereich von 5 μm bis 80 μm in kleinere Bereiche von je 2,5 μm Breite festgelegt. Die Glomeruli, die jeweils in diesen Bereich fallen, wurden

gezählt und mit der Gesamtanzahl ins Verhältnis gesetzt. Zur statistischen Analyse der Glomeruliverteilung bzw. um die Unterschiede der Kurvenverschiebung zu verdeutlichen, wurden die Häufigkeiten der jeweiligen $2,5\ \mu\text{m}$ Abschnitte mit der kleinsten Größe des Bereichs multipliziert und die erhaltenen Produkte aufsummiert (= Größenhäufigkeitsprodukte).



Kontrolle

Abb. 9: Vermessen einer Kontrollniere

Hier ist beispielhaft das Vermessen des Glomerulusdurchmessers (\emptyset) und des zum jeweiligen Glomerulus dazugehörigen Abstands zur Rinde (Δ) an einer unbehandelten Kontrollniere gezeigt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Zur Vermehrung und Analyse von genomischer DNA und Gesamt-RNA wurden molekularbiologische Standardmethoden gemäß den etablierten Vorschriften bzw. den Protokollen des Herstellers durchgeführt.

Darunter fallen:

- Photometrische Bestimmung der DNA- oder RNA-Konzentration in Lösung
- Elektrophoretische Auftrennung von DNA (1 - 2 % Agarose-Minigele)
- Isolierung von Gesamt-RNA (RNeasy™ – Kit, Qiagen)
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse der verschiedenen Knockout-Stämme wurden den, von den Elterntieren am ca. 18. Tag abgesetzten Jungtieren, eine 1 - 2 mm lange Schwanzbiopsie entnommen. Zusätzlich bekamen sie eine Ohrmarke mit laufender Nummer.

Die Schwanzbiopsien wurden zur Auflösung des Gewebes mit 500 μ l Tail-Lyse-Puffer und 5 μ l Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Cup mit 500 μ l vorgelegtem Isopropanol überführt. Die so präzipitierte DNA konnte durch leichtes Invertieren der Cups sichtbar gemacht werden und wurde anschließend bei 10.000 g für 1 min präzipitiert. Das Pellet wurde mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 250 μ l TE-Puffer aufgenommen und bei 55 °C für 2 h geschüttelt. Die DNA-Lösung konnte nun direkt für eine PCR-Analyse eingesetzt werden.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Nierengewebe

RNA wurde mit Hilfe von peqGold RNAPure gewonnen, eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Diese Lösung erlaubt es, in einem Schritt die Proben zu lysieren, RNasen zu inaktivieren und die RNA zu stabilisieren. Durch Zugabe von Chloroform wird das Lysat extrahiert, mit Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt und am nächsten Tag mit Ethanol gewaschen.

Erststrangsynthese (RT-PCR)

Das Umschreiben von RNA in cDNA und die anschließende Amplifikation der cDNA wurde mittels einer Two-Step RT-PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass in einem ersten Schritt die cDNA synthetisiert wird, die dann als *template* für eine anschließende PCR eingesetzt wird. Die cDNA Synthese wurde mittels des Verso cDNA Kits von der Firma Thermo Scientific durchgeführt. In diesem Kit ist ein DNase Verdau integriert. Als Primer wurde Oligo-dT verwendet. cDNA, die als Matrize für eine Real-time PCR dienen sollte, wurde mittels hexamerer Primer synthetisiert.

Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Diese Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus. So ist es möglich, die Amplifikation bereits in der frühen exponentiellen Phase der qRT-PCR zu detektieren. Ein entscheidender Vorteil gegenüber der konventionellen PCR, in welcher nur der Endpunkt der PCR gezeigt werden kann. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Sybr-Green I verwendet, ein unsymmetrischer Cyanfarbstoff, der sequenzunspezifisch in der kleinen Furche der DNA bindet. Durch Interkalation mit doppelsträngiger DNA nimmt die Fluoreszenz zu, wobei die Fluoreszenz proportional zu der vorliegenden DNA-Konzentration von Zyklus zu Zyklus ansteigt. Daher lässt sich nach jedem Zyklus ein Amplifizieren des Produktes in "Echtzeit" durch einen Anstieg der Fluoreszenz verfolgen. Von den gewonnenen Daten über den Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion lässt sich auf die Ausgangsmenge an *template* schließen. Dazu wird ein Schwellenwert (Ct-Wert; cycle threshold) am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase in der Amplifikationskurve festgelegt. Der Ct-Wert beschreibt also die Anzahl an Zyklen, die nötig waren, um den Schwellenwert zu erreichen. Je höher nun der Ct-Wert, umso mehr Zyklen waren notwendig diesen Schwellenwert zu überschreiten und desto geringer die Ausgangsmenge an cDNA. Die Berechnung erfolgte mittels der $\Delta\Delta Ct$ Methode. Dabei wird das Verhältnis zweier cDNA Mengen durch folgende Formel berechnet:

$$2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)}$$

$\Delta Ct1$: Differenz der Ct-Werte von Referenz cDNA und internen Standard

$\Delta Ct2$: Differenz der Ct-Werte von der zu bestimmenden cDNA und der internen Vergleichsgruppe

Die Messungen erfolgten in dreifacher Bestimmung. Als interner Standard diente die 18S-RNA oder GAPDH-RNA.

Die Reaktionen wurden in einer 96-well Platte in einem Gesamtvolumen von 10 μ l/well durchgeführt. Es wurden 5 μ l Sybr-Green Rox Mix und je 1 μ l Primer gemischt und diese 7 μ l in die wells vorgelegt. Anschließend wurden 2,5 μ l H₂O mit 0,5 μ l cDNA gemischt und zusammen in die wells gegeben. Die Platte wurde verschlossen, kurz abzentrifugiert und in das ABGene Gerät gestellt und das folgende Programm gestartet:

1. 15 min 95 °C
2. 15 sec 95 °C
3. 1 min 60 °C (die Schritte 2 und 3 wurden 40x wiederholt)

2.2.3 Biochemische Methoden

Proteinbestimmung

Der Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} in einer alkalischen Lösung abhängig von der vorhandenen Proteinkonzentration. Cu^{+} reagiert mit der Bicinchoninsäure zu einem violetten Reaktionsprodukt, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt und photometrisch gemessen werden kann. Als Standard wurde Bovines Serum Albumin (BSA) verwendet.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der eindimensionalen SDS-PAGE werden Proteine ihrer molekularen Masse entsprechend aufgetrennt. SDS (sodium dodecyl sulfate) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine effektiv überdeckt. Bei dem verwendeten diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Proben zunächst in einem oberen Sammelgel mit großer Polyacrylamidporenweite auf eine schmale Bande konzentriert, um so eine gleichmäßige Auflösung zu erzielen (80 V bis zur Sammel-/Trenngelgrenze). Die Auftrennung erfolgte in einem sich anschließenden 15 %igem Trenngel, bis die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

Zusammensetzung der Gele:

Sammelgel:	500 µl upper Tris (4x)
	250 µl Acrylamid (40 %)
	1,2 ml H_2O
	20 µl SDS (10 %)
	20 µl APS (10 %)
	2 µl TEMED

Trenngel (15 %ig):	2,5 ml lower Tris (4x)
	5 ml Acrylamid (40 %)
	2,4 ml H ₂ O
	98,4 µl SDS (10 %)
	49,2 µl APS (10 %)
	4,92 µl TEMED

Die aufzutrennenden Proteine wurden mit 4-fachem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min denaturiert.

Zur Auftrennung der Proteine, entsprechend ihrer molekularen Masse, wurde das System von Biorad verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für etwa eine Stunde.

Western Blot

Im Western Blot Verfahren werden Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran mittels Nass-Blotverfahrens transferiert und immobilisiert. Das hierbei entstandene Abbild der Gelelektrophorese ist einer weiteren Detektion mittels Immunodetektion zugänglich.

Das Gel wurde luftblasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und von beiden Seiten mit je einem in Transferpuffer äquilibrierten Whatman-Filterpapier und Schwämmchen in den Bloteinsatz geschichtet. Der Bloteinsatz wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer zusammen mit einem Eispack eingesetzt. Der Proteintransfer wurde für 1 h bei Raumtemperatur bei einer konstanten Spannung von 100 V oder bei 20 V über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

Die Membran wurde nach dem Blotten kurz mit Ponceau S Lösung angefärbt und gleich wieder mit PBS entfärbt, um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Anschließend wurden unspezifische Bindungen der Membran durch Inkubation mit 5 % Magermilchpulver in TN-Puffer für mindestens 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen, der Primärantikörper in 3 % Magermilchpulver TN-Puffer hinzugegeben und in Folie eingeschweißt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator. Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind unter Punkt 2.1.3.2 aufgelistet. Am nächsten Tag wurden nicht bindende Antikörper durch dreimaliges Waschen in PBST entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper in 5 % Milchpulver in PBS 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer

wurde die Membran kurz mit ECL-Plus-Reagenz (ECL-Plus-Detektions-Kit; GE Healthcare) überschichtet, dann in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Entwicklungskassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde für verschiedene Expositionszeiten (ca. 1 - 10 min) ein Fotofilm aufgelegt und anschließend entwickelt.

2.2.3.1 ELISA

PGE₂ ELISA

Dieser Test wurde mittels des PGE₂ Correlate EIA-Kit von assay designs (Messbereich: 40 pg/ml bis 2,5 ng/ml) genau nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden in die Reaktion unterschiedliche Verdünnungen an Spontanurin eingesetzt. Die Urine von Kontrolltieren und Tieren, die mit Furosemid und Telmisartan behandelt worden waren, wurden jeweils 1:10 verdünnt eingesetzt. Urine von SC-236 behandelten Tieren wurden 1:5 verdünnt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot.

Kreatinin ELISA

Kreatinin wurde mittels des Kreatinin ELISA Kits von Cayman Biochemicals (Messbereich: 0 mg/dl bis 15 mg/dl) genau nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dieser Test basiert auf der Jaffé-Reaktion, bei der Kreatinin in alkalischer Lösung zusammen mit Pikrinsäure einen Meisenheimer-Komplex bildet, dessen rote Farbe photometrisch gemessen werden kann. Eingesetzt wurden 15 µl 1:5 verdünnter Spontanurine.

2.2.4 COX-Aktivitäts Test

Die Nieren wurden gewogen und in 2 V eiskaltem Gewebepuffer mittels Ultraturax homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend beschallt und bei 3000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt und die Lösung bei -80 °C aufbewahrt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde in der folgenden Reaktion je 100 µg Protein eingesetzt.

Gewebepuffer und Protein und ggf. Inhibitoren wurden in einem Gesamtvolumen von 250 µl in ein vorbereitetes Cup vorgelegt. Die Proben mit den Inhibitoren wurden auf Eis 30 min inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 2 min bei 37 °C warm gestellt und anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µM Arachidonsäure (AA) gestartet und für 10 min bei

37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 50 µl 1 % Ameisensäure abgestoppt. Die Bestimmung der Prostaglandine erfolgte in unserem Institut mittels LC-MS/MS (Schmidt et al., 2005) und wurden freundlicherweise von Yannik Schreiber und Carlo Angioni durchgeführt.

2.2.5 Messung der Plasma-Reninkonzentration

Mittels Ultramikroassay erfolgte die Ermittlung der Plasma-Reninkonzentration. Der Test basiert auf der Messung des neu gebildeten Angiotensin I (Lykkegard and Poulsen, 1976). Für jede Plasmaprobe wurden fünf serienmäßige Verdünnungen hergestellt. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Linearität über drei serielle Verdünnungen wurde als Voraussetzung für die Akzeptanz eines Wertes festgesetzt. Die Renin-Konzentrationen wurden in Goldblatt Units (GU) angegeben, die mit Reninstandards des Nationalen Institutes für biologische Standards und Kontrollen (National Institute for Biological Standards and Control (Hertfordshire, UK)) verglichen wurden. Die Bestimmung der Reninwerte erfolgte freundlicherweise durch Dr. Boye Jensen, Abteilung für Physiologie und Pharmakologie der Universität von Süd-Dänemark (Odense).

2.2.6 Statistik

Alle Berechnungen erfolgten mittels der Softwareprogramme MS Excel 2000 und Graph Pad Prism 4. Die Daten wurden auf Signifikanzen hin untersucht. Dazu wurde bei Vergleich mehrerer Gruppen der ANOVA (Analysis of variance) Test mit anschließender Bonferroni oder Dunnett Korrektur angewendet. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen kam der t-Test zur Anwendung. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.